

## 明細書

## アフィニティー樹脂

## 技術分野

5 本発明は、アフィニティークロマトグラフィー用の固相担体として有用な樹脂（以下、単にアフィニティー用樹脂ともいう）および当該樹脂を調製するのに好適なモノマーに関する。より詳しくは、非特異的タンパク質の吸着が少なく、且つ安定性の高いアフィニティー用樹脂に関する。

## 背景技術

10 近年、特異的分子間相互作用を基盤とした手法を用い、ある特定の分子に特異的な相互作用を有する分子を探索する試みが盛んに行われている。この中で、注目値する生理活性を示す医薬品のような低分子化合物を適当な固相担体に固定化し、ターゲットを探索する方法が注目を集めている。このいわゆるアフィニティー樹脂と呼ばれる手法を用いたターゲット探索研究は着目する生理活性を示す低分子化合物のターゲットを効率的に同定することが可能であることから多くの研究が行われ、  
15 具体的な成果もいくつか報告されている。これらの研究例としては、1) 1989年のシュライバー教授による免疫抑制剤FK506の結合タンパク質FKBP (FK506 binding proteins) の発見 (FK506の細胞内結合タンパク質としてのFKBP12の発見、「Nature, 英国, 1989年10月26日, 第341巻, p. 758-760」参照) や、2) 抗癌剤Trapoxinのターゲットタンパク質としてのHDAC発見 (「Science, 米国, 1996年4月19日, 第272巻, p. 408-411」参照)、3) 半田等によるE3330のターゲットタンパク質としてのRef-1の発見 (「Nature Biotechnology, 英国, 2000年8月, 第18巻, 第8号, p. 877-881」参照) が有名である。

25 また、診断薬の領域においても、出来るだけ病気早期に病巣の存在を非侵襲的に確認できれば治療の効果がアップすることから、例えば特定の癌に特異的に発現する微量タンパク質等のマーカーと呼ばれる物質を、採取した患者の血液等から同定

する研究も盛んに行われている。

しかし、これまでに上記手法において、固定化したリガンド分子と特異的な分子間相互作用を行うタンパク質以外の非特異的タンパク質の存在が問題となってきた。本発明者らは、リガンドをアフィニティー樹脂に結合させる際に親水性スペーサーを介在させることによって、固定化したリガンド分子および／またはアフィニティー樹脂自身と、該リガンドに対して特異的でない分子との非特異的な相互作用を低減させることを既に見出している（特願2002-222226（WO2004/025297））。しかしながら、非特異的な相互作用の低減化という点のみ考えた場合には、アガロース系アフィニティー樹脂（例えばAffigel）のように固相担体自身が高い親水性を有する方がアフィニティー樹脂としては優れていることになる。しかしながらアガロース系樹脂はその構成成分の化学的特性から通常合成で用いる多くの系で不可逆的な変性を引き起こし、広範なリガンドの研究には必ずしも適しているとは言えない欠点を有している。安定性という観点からは、メタクリレート系の樹脂（例えばTOYOPEARL）が、化学的にも安定で多くの有機溶媒内での反応に十分な耐性を有している。

分子間の非特異的な相互作用がアガロース系アフィニティー樹脂に匹敵する程低減化され、且つメタクリレート系樹脂に匹敵する程の安定性を有する樹脂の開発が求められていた。

本発明は、分子間の非特異的な相互作用が低減化され得る、且つ安定性に優れた樹脂、特にアフィニティー樹脂を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

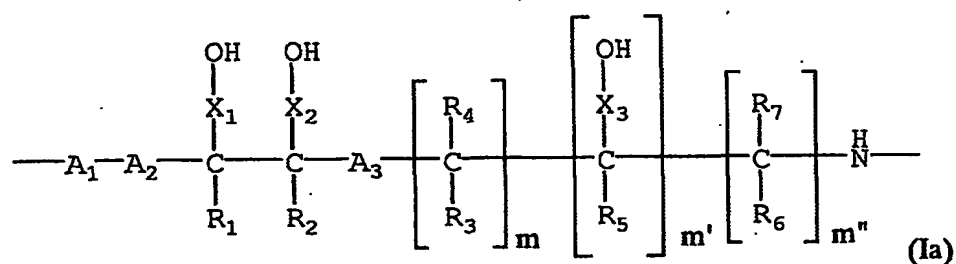
本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究し、これまでに開発してきた親水性スペーサー（特願2002-222226（WO2004/025297））が組み込まれたメタクリレートモノマーを樹脂原料とし、それを重合反応に付すことにより、メタクリレート系の樹脂ではあるが、アガロース系樹脂に匹敵する親水的特性を有するアフィニティー用樹脂の合成を試み、それに成功して本発明を完成するに至った。

即ち本発明は下記の通りである。

〔1〕原料となるモノマーを重合して得られる樹脂であつて、該モノマーには親水性スペーサーが組み込まれていることを特徴とする樹脂。

〔2〕モノマーが（メタ）アクリル系モノマーである、上記〔1〕記載の樹脂。

5 〔3〕親水性スペーサーが下記式（I a）～（I e）からなる群より選択されるいずれか1つの式で表される部分構造を少なくとも1つ有するものである、上記〔1〕または〔2〕記載の樹脂。



（式（I a）中、

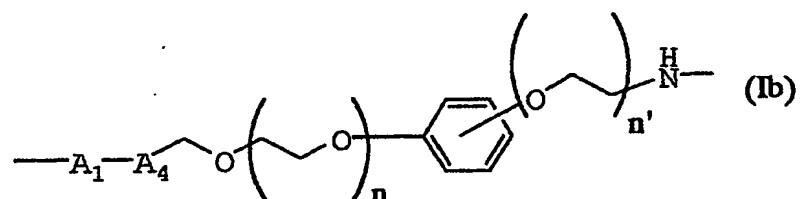
10  $\text{A}_1$ は $\text{---O---}$ または $\text{---NH---}$ であり、 $\text{A}_2$ は単結合または低級アルキレン基であり、 $\text{A}_3$ は適当な連結基であり、

$\text{X}_1 \sim \text{X}_3$ はそれぞれ同一または異なって単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

15  $\text{R}_1 \sim \text{R}_7$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $\text{---CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

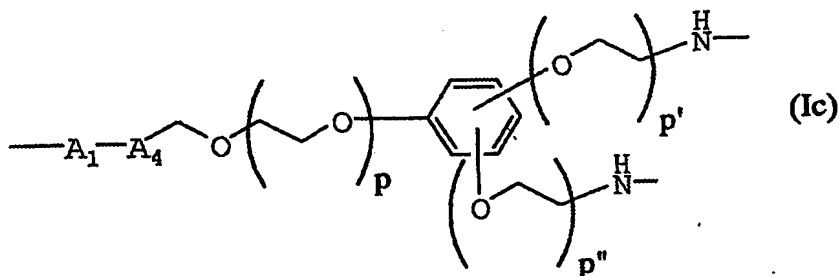
$m$ は0～2の整数であり、 $m'$ は0～10の整数であり、 $m''$ は0～2の整数であり、

$\text{R}_3 \sim \text{R}_7$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 $\text{X}_3$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい）；



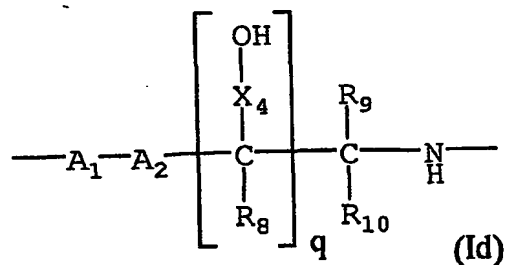
(式 (I b) -中、

$A_1$  は  $-O-$  または  $-NH-$  であり、 $A_4$  は低級アルキレン基であり、  
 $n$  および  $n'$  はそれぞれ同一または異なって 1 ~ 10 の整数である) ;



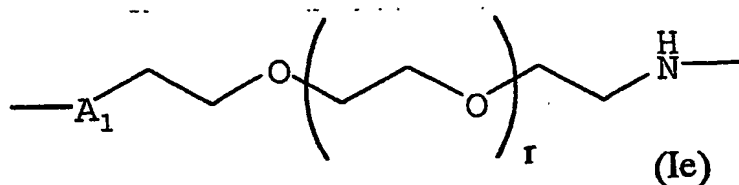
5 (式 (I c) 中、

$A_1$  は  $-O-$  または  $-NH-$  であり、 $A_4$  は低級アルキレン基であり、  
 $p$ 、 $p'$  および  $p''$  はそれぞれ同一または異なって 1 ~ 10 の整数である) ;



(式 (I d) 中、

- 10  $A_1$  は  $-O-$  または  $-NH-$  であり、 $A_2$  は単結合または低級アルキレン基であり、  
 $X_4$  は単結合あるいは炭素数 1 ~ 3 の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、  
 $R_8 \sim R_{10}$  はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数 1 ~ 3 の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-CH_2OH$  あるいは水酸基であり、
- 15  $q$  は 1 ~ 7 の整数であり、  
 $R_8$  が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 $X_4$  が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい) ;

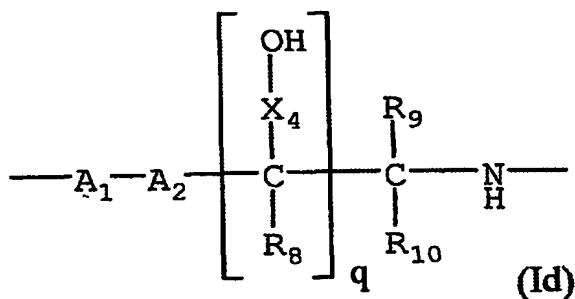


(式 (I e) 中、

$\text{A}_1$  は  $\text{---O---}$  または  $\text{---NH---}$  であり、

$r$  は 1 ~ 10 の整数である)

- 5 [4] 親水性スペーサーが下記式 (I d) で表される部分構造を少なくとも 1 つ有するものである、上記 [3] 記載の樹脂。



(式 (I d) 中、

$\text{A}_1$  は  $\text{---O---}$  または  $\text{---NH---}$  であり、 $\text{A}_2$  は単結合または低級アルキレン基であり、

- 10  $\text{X}_4$  は単結合あるいは炭素数 1 ~ 3 の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

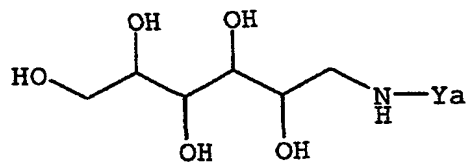
$\text{R}_8 \sim \text{R}_{10}$  はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数 1 ~ 3 の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $\text{---CH}_2\text{OH}$  あるいは水酸基であり、

$q$  は 1 ~ 7 の整数であり、

- 15  $\text{R}_8$  が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 $\text{X}_4$  が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい)

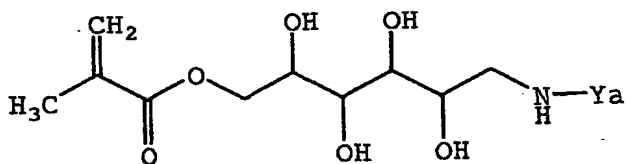
[5] 式 (I d) において、 $\text{A}_1$  が  $\text{---O---}$  であり、 $\text{A}_2$  がメチレン基であり、 $\text{X}_4$  が単結合であり、 $q$  が 4 であり、複数個存在する  $\text{R}_8$  が同一で水素原子であり、 $\text{R}_9$  および  $\text{R}_{10}$  が水素原子である、上記 [4] 記載の樹脂。

〔6〕 親水性スパーサーが、下記式で表される化合物である、上記〔1〕記載の樹脂。



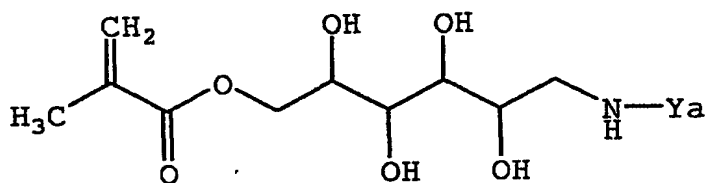
(式中 Y a は水素原子またはアミノ基の保護基である)

5 〔7〕 下記式で表される化合物の共重合体を含む、上記〔5〕記載の樹脂。



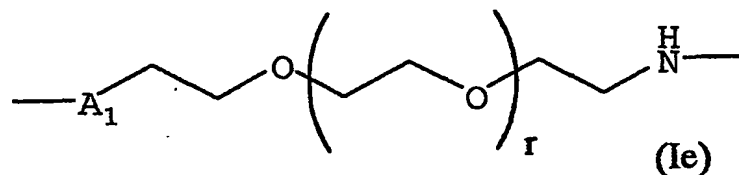
(式中 Y a は水素原子またはアミノ基の保護基である)

〔8〕 下記式で表される化合物。



10 (式中 Y a は水素原子またはアミノ基の保護基である)

〔9〕 親水性スパーサーが下記式 (I e) で表される部分構造を少なくとも 1 つ有するものである、上記〔3〕記載の樹脂。



(式 (I e) 中、

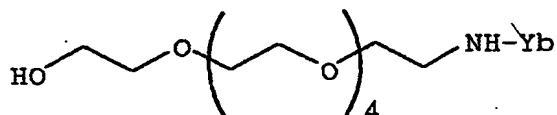
$A_1$ は—O—または—NH—であり、

$r$ は1～10の整数である)

〔10〕式(I e)において、 $A_1$ が—O—である、上記〔9〕記載の樹脂。

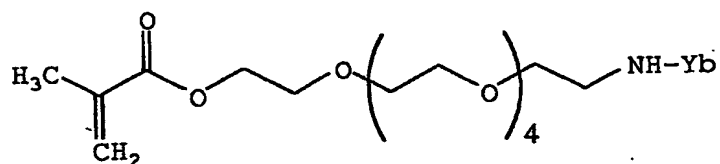
〔11〕親水性スペーサーが、下記式で表される化合物である、上記〔1〕記載の

5 樹脂。



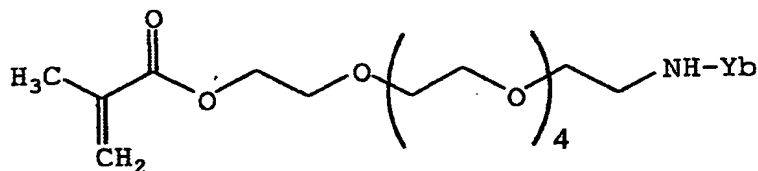
(式中Y bは水素原子またはアミノ基の保護基である)

〔12〕下記式で表される化合物の共重合体を含む、上記〔10〕記載の樹脂。



10 (式中Y bは水素原子またはアミノ基の保護基である)

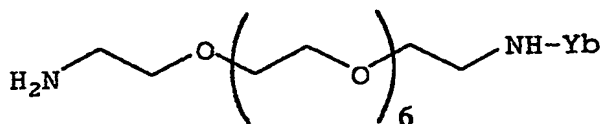
〔13〕下記式で表される化合物。



(式中Y bは水素原子またはアミノ基の保護基である)

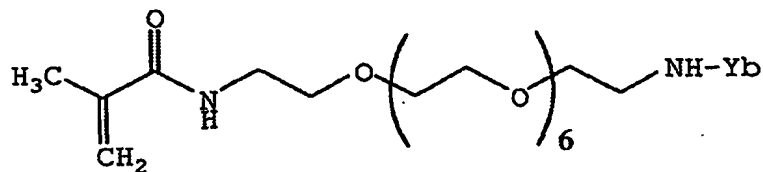
〔14〕式(I e)において、 $A_1$ が—NH—である、上記〔9〕記載の樹脂。

15 〔15〕親水性スペーサーが、下記式で表される化合物である、上記〔1〕記載の樹脂。



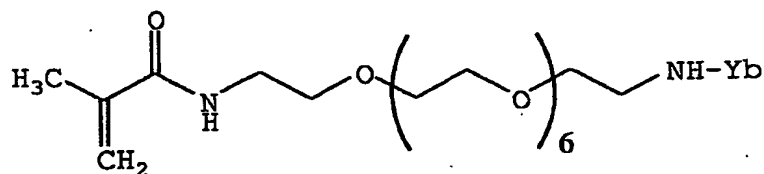
(式中Y bは水素原子またはアミノ基の保護基である)

〔16〕下記式で表される化合物の共重合体を含む、上記〔14〕記載の樹脂。



(式中Y bは水素原子またはアミノ基の保護基である)

5 〔17〕下記式で表される化合物。



(式中Y bは水素原子またはアミノ基の保護基である)

〔18〕上記〔1〕～〔7〕、〔9〕～〔12〕および〔14〕～〔16〕のいずれか1つに記載の樹脂にリガンドを固定化してなる、アフィニティークロマトグラフィー用固相担体。

〔19〕該リガンドのターゲット分子探索用である、上記〔18〕記載の固相担体。

〔20〕リガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子のスクリーニング方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法：

(i) リガンドを上記〔1〕～〔7〕、〔9〕～〔12〕および〔14〕～〔16〕のいずれか1つに記載の樹脂に固定化する工程、

(i i) ターゲット分子を含むかまたは含まない試料を上記(i)で得られたリガンドが固定化された樹脂に接触させる工程、

(i i i) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を同定し、解析する工程、および

(i v) 上記(i i i)で得られた解析結果に基づいてリガンドに対して特異的な相互作用を有する分子をターゲット分子と判断する工程。



〔21〕試料中の、リガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子を測定する方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法：

(i) リガンドを上記〔1〕～〔7〕、〔9〕～〔12〕および〔14〕～〔16〕のいずれか1つに記載の樹脂に固定化する工程、

5 (ii) 試料を上記(i)で得られたリガンドが固定化された樹脂に接触させる工程、

(iii) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を測定し、解析する工程、および

10 (iv) 上記(iii)で得られた解析結果に基づいてリガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子を測定する工程。

#### 図面の簡単な説明

図1は、親水性スペーサーを組み込んだモノマー成分を重合してなる樹脂にリガンド(FK506)を固定化することによって得られるFK506固定化固相担体上へのタンパク質の非特異的な吸着の程度を示す図である。FK506のターゲット分子であるFKBP12の値を1とした場合の各非特異的タンパク質の吸着の程度を相対的に表した。

#### 発明の詳細な説明

本発明の樹脂を合成するにあたって使用されるモノマーは、親水性スペーサーが組み込まれていて、且つ化学的、物理的に安定な重合体を形成することができるものであればベースとなる構造は特に限定されないが、好ましくは(メタ)アクリル酸のエステルあるいはアミドである。便宜上、親水性スペーサーが導入されているモノマーを親水性モノマーと称する。

本発明において「樹脂」とは、上記したモノマーの重合体を含むものであって、通常、当分野で使用し得る程度の形状や物理化学的性質を有するものであれば特に限定されない。例えばアフィニティークロマトグラフィー操作において、カラム等に充填し得る形状や物理化学的性質、あるいは遠心操作により溶液と分離できるような形状や物理的性質を有するものが好ましく使用される。

本発明において、「親水性スペーサー」とは、樹脂と、当該樹脂に固定化されるリガンド分子との間に介在する基となる物質であって、親水性である。親水性の程度については後述する。ここで「介在する」とは、該親水性スペーサーが、樹脂の構成成分であるモノマー中に存在する官能基からリガンド内に存在する官能基までの間に存在することを意味する。該親水性スペーサーは、その一端をモノマー中の官能基と結合し、他端をリガンド内の官能基と結合する。また当該親水性スペーサーは、結果的に樹脂と固定化されるリガンドとの間に介在する基として機能し得るものであれば2以上の化合物を順次、結合、重合させることによって得られるものであっても構わない。モノマー中への親水性スペーサーの組み込みは、例えば親水性モノマーとして親水性スペーサーが組み込まれた（メタ）アクリル系モノマーを調製する場合には、アクリル酸あるいはメタクリル酸の酸ハライドと対応する親水性スペーサーとの反応あるいはアクリル酸あるいはメタクリル酸と通常のアミド結合あるいはエステル形成反応等によって合成されるアミド、エステル等の共有結合あるいは非共有結合であり、いずれも当分野で公知の材料ならびに反応によって行なわれる。

本発明において使用する親水性スペーサーとしては、得られ得る樹脂の表面の疎水的な性質を変化させ、非特異的な分子間相互作用を排除するかあるいは抑制するようなものであれば特に限定されないが、好ましくは樹脂（より詳しくは樹脂を構成するモノマー）およびリガンドと結合した状態（以下、この様な状態にある親水性スペーサーを便宜上「親水性スペーサー部分」と称する）で水素結合アクセプター（HBA ; hydrogen bond acceptor）数が2以上、水素結合ドナー（HBD ; hydrogen bond donor）数が1以上であり、通常、HBA数が2～12程度、HBD数が1～12程度のものである。より好ましくは樹脂およびリガンドと結合した状態でHBA数が6以上であるか、HBD数が5以上であるか、あるいは該スペーサー1分子あたりのHBA数およびHBD数の総計が9以上となるような化合物である。またこれらの条件を2つもしくは全て満たすような化合物であつてもよい。

ここで、水素結合アクセプター数（HBA数）とは、含まれる窒素原子（N）と酸素原子（O）の総数であり、水素結合ドナー数（HBD数）とは、含まれるNHとOHの総数である（C. A. Lipinski et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 23（1997）3-25）。本発明においては、樹脂とリガンドとの間に介在する基であっても、メタクリル酸クロライド等のモノマー合成の出発原料としての化合物に由来するNやO、あるいはNHやOHはそれぞれHBA数やHBD数に含めない。さらに親水性スペーサーに由来するものであってもメタクリル酸クロライド等との結合に直接利用されるアミノ基や水酸基に由来するNやO、あるいはNHやOHもそれぞれHBA数やHBD数に含めない。リガンドと親水性スペーサーとの結合をより容易にする為にリガンドと親水性スペーサーの間に任意の基を固定化の前にあらかじめリガンドに結合あるいは導入することができる（当該基をリンカーともいう）が、これらはリガンドに応じて適宜選択されるものであって、固相担体の疎水的な性質の緩和への寄与が少ないと考えられるので、当該基に含まれるNやO、あるいはNHやOHも本発明におけるHBD数やHBA数には含めない。尚、リンカーの導入には、アミド結合や縮合、シッフ塩基、C-C結合、エステル結合、水素結合、疎水相互作用等の種々の共有結合あるいは非共有結合が利用され、いずれも当分野で公知の材料ならびに反応により実施される。

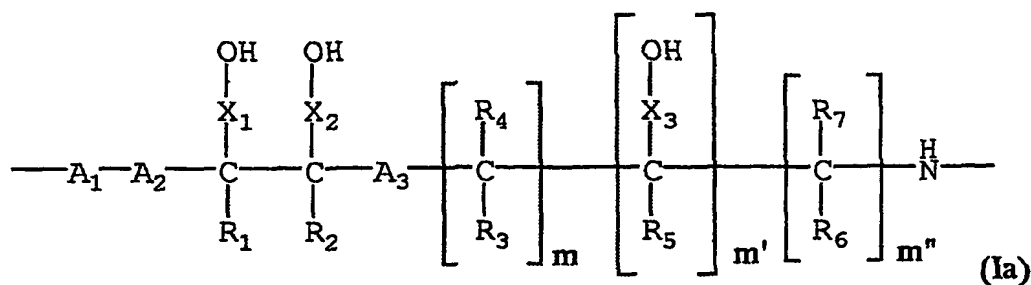
本願発明の状況下では親水性スペーサーのHBA数は2以上（通常2～12）、HBD数は1以上（通常1～12）である。非特異的な相互作用を十分に抑制するためには（i）HBA数が6以上、（ii）HBD数が5以上、（iii）HBA数とHBD数の総計が9以上、というこれらの条件を少なくとも1つ、好ましくは2つ以上満たすことが好ましい。本発明において親水性スペーサーのHBD数あるいはHBA数の上限は、最終的に当該親水性スペーサーが組み込まれたモノマーを重合して樹脂が合成できれば特に制限されるものではなく、通常、上記したようにそれぞれ12程度である。

さらに本発明において使用する親水性スペーサーは、それ自体非特異的な相互作用

用（例えば該スぺーサーへのタンパク質の吸着等）を生じるものでないことが好ましい。具体的には、該スぺーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になるような官能基を有さないことであり、当該官能基としてはアミノ基（ただし、該アミノ基に該アミノ基の塩基性を減弱させる官能基（例えばカルボニル基、スルホニル基）が結合している場合は除く）、カルボキシル基、硫酸基、硝酸基、ヒドロキサム酸基等が挙げられる。ここで水溶液中とは、具体的には、固相上でのリガンドとターゲット分子との相互作用を解析する過程、ターゲット分子を選別する過程、あるいはターゲット分子をスクリーニングする為に実施されるリガンドとターゲット分子との結合反応（特異的な相互作用に基づいた反応）が行われる環境下であって、

10 親水性スぺーサーが電荷的に陽性あるいは陰性になるような官能基を有する場合にはイオン化するような条件下である。かかる条件は、例えば水溶液中、pH 1～11、温度 0～100℃であり、好ましくは pH 中性付近（pH 6～8）、約 4℃～約 40℃程度である。

例えば、本発明の親水性スぺーサーは、下記式（I a）～（I e）からなる群より選択されるいずれか 1 つの式で表される部分構造を少なくとも 1 つ有する化合物である。



（式（I a）中、

A<sub>1</sub>は—O—または—NH—であり、A<sub>2</sub>は単結合または低級アルキレン基であり、

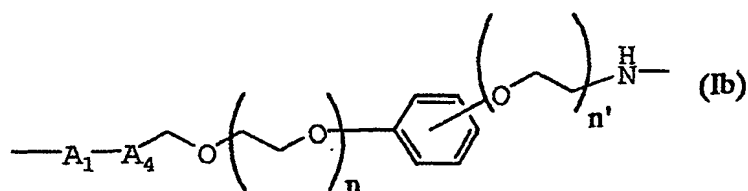
A<sub>3</sub>は適当な連結基であり、

X<sub>1</sub>～X<sub>3</sub>はそれぞれ同一または異なって単結合あるいは炭素数 1～3 の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

$R_1 \sim R_7$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

$m$ は0～2の整数であり、 $m'$ は0～10の整数であり、 $m''$ は0～2の整数であり、

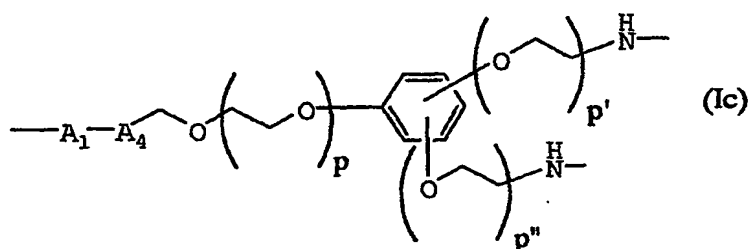
- 5  $R_3 \sim R_7$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 $X_3$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい)；



(式 (I b) 中、

$A_1$ は $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ であり、 $A_4$ は低級アルキレン基であり、

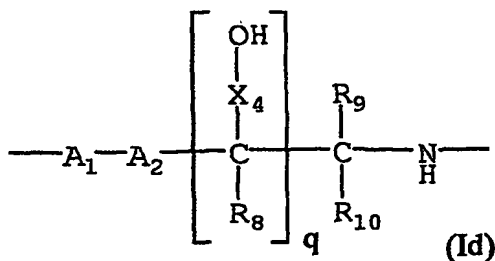
- 10  $n$ および $n'$ はそれぞれ同一または異なって1～10の整数である)；



(式 (I c) 中、

$A_1$ は $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ であり、 $A_4$ は低級アルキレン基であり、

$p$ 、 $p'$ および $p''$ はそれぞれ同一または異なって1～10の整数である)；



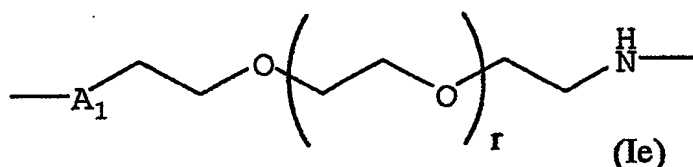
(式 (I d) 中、

$A_1$ は—O—または—NH—であり、 $A_2$ は単結合または低級アルキレン基であり、 $X_4$ は単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

5  $R_8 \sim R_{10}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

$q$ は1～7の整数であり、

$R_8$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 $X_4$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい；



10 (式 (I e) 中、

$A_1$ は—O—または—NH—であり、

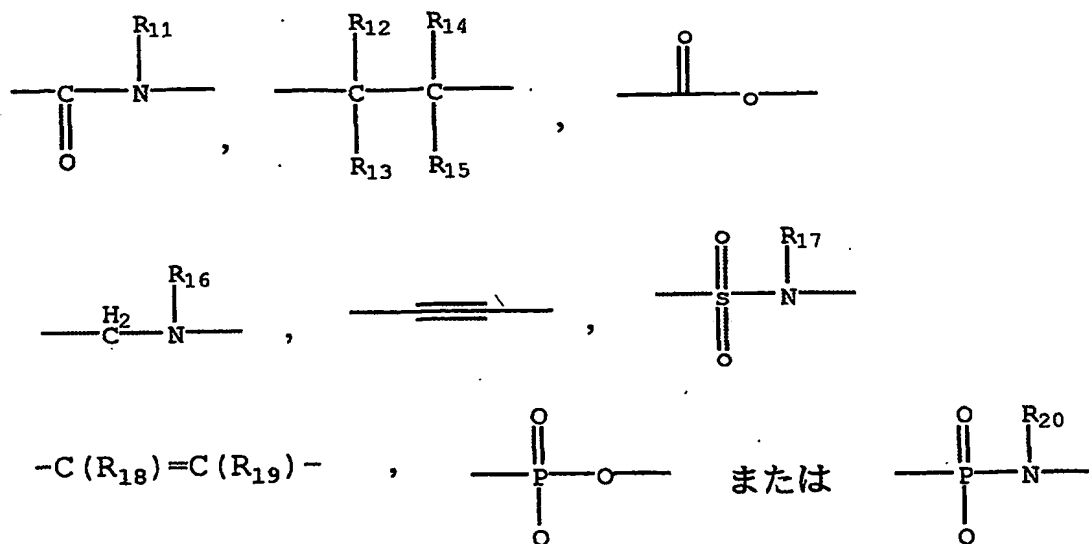
$r$ は1～10の整数である)。

本明細書において各基の定義中「低級アルキレン基」とは、炭素数1～6の直鎖または分枝状のアルキレン基を意味し、具体的にはメチレン基、エチレン基、プロピレン基、イソプロピレン基、ブチレン基、イソブチレン基、*sec*-ブチレン基、*tert*-ブチレン基、ペンチレン基、イソペンチレン基、ネオペンチレン基、*tert*-ペンチレン基、ヘキシレン基、イソヘキシレン基等が挙げられる。

「炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基」としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基等が挙げられる。

20 本明細書において、「炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基」とは無置換のメチレン基ならびに上記した炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で1または2置換されたメチレン基を意味する。

「適当な連結基」とは隣接する各々の部位を連結することができる基であれば特に限定されないが、具体的には以下の基が用いられる。



(式中、 $\text{R}_{11}$ は水素原子または炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基であり、 $\text{R}_{12} \sim \text{R}_{15}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、 $\text{R}_{16} \sim \text{R}_{20}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基（該アルキル基は水酸基、カルボン酸基、アミノ基等の親水性置換基で置換されていてもよい）である）

以下に本発明においてモノマーに組み込み得る親水性スペーサーの一般的製法について記載するが、記載される以外の通常当分野で実施される方法、あるいはそれらの方法を組み合わせた方法によっても又製造し得ることは当業者には明らかである。

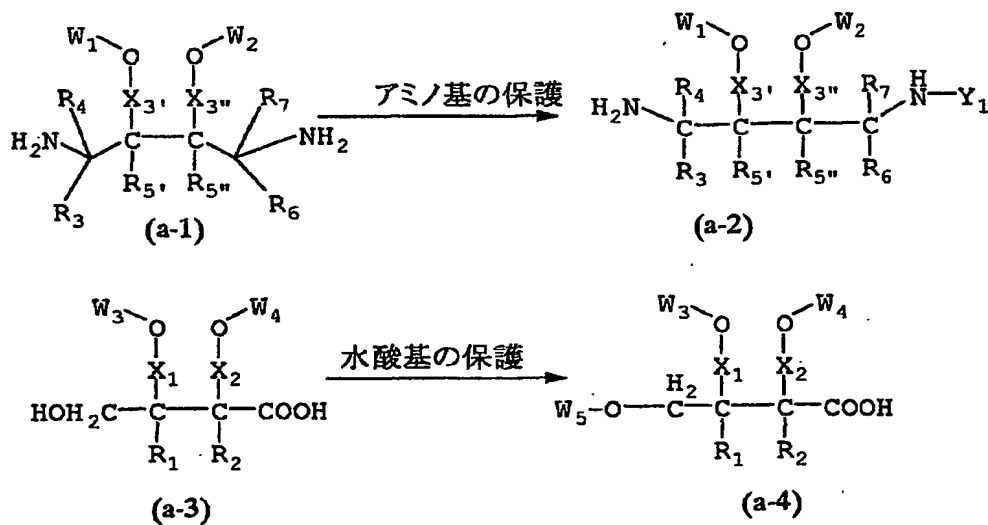
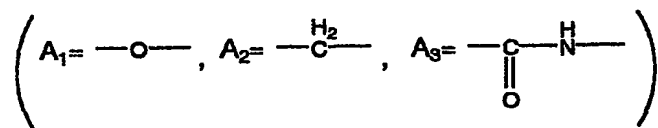
尚、本明細書で使用する略語は下記の通りである。

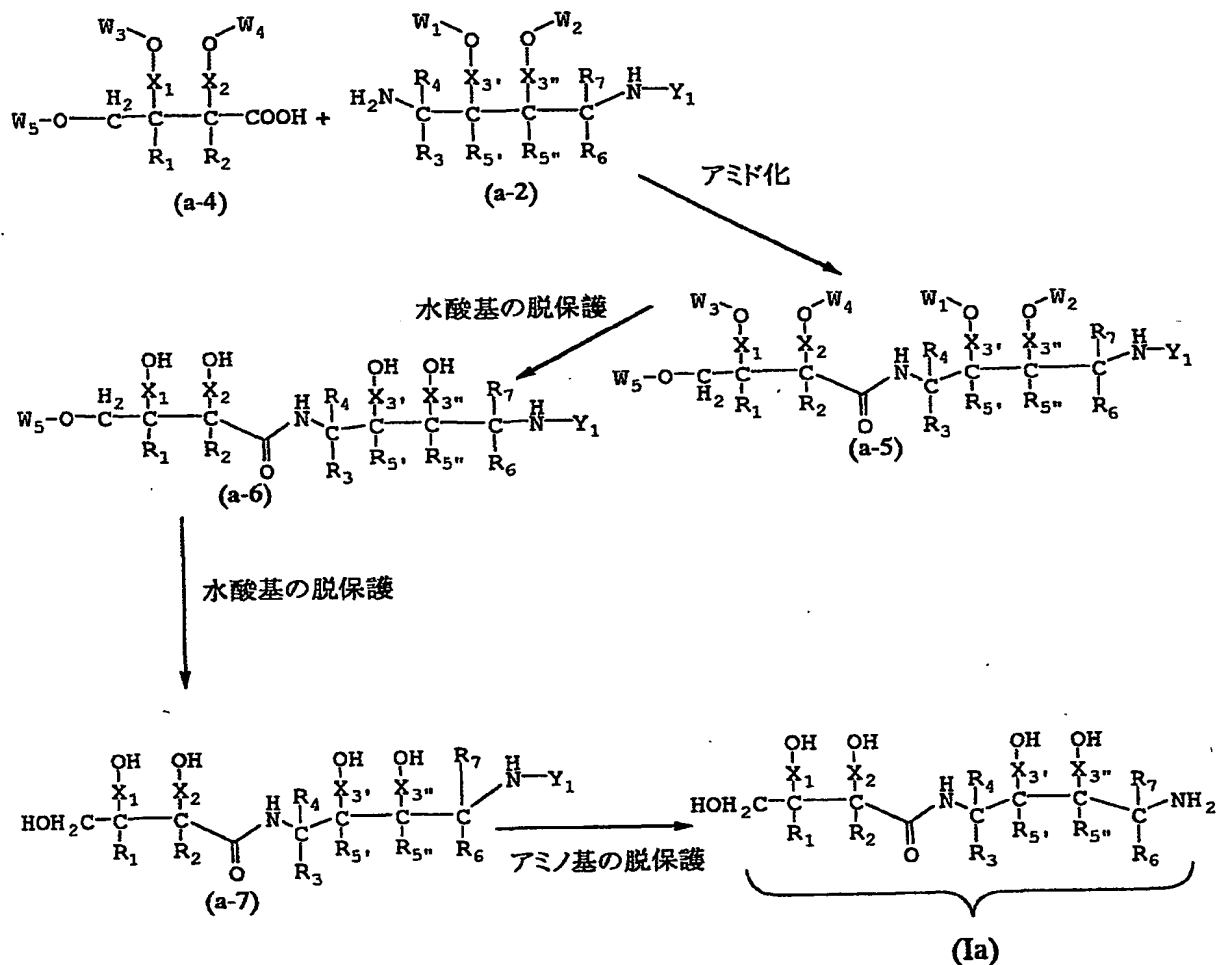
略語	正式名称
Ac	アセチル基
AET	アミノエチルタータリックジアミド
AIBN	アゾビスイソブチロニトリル
AMT	アミノメチルタータリックジアミド
Boc	tert-ブトキシカルボニル
Boc <sub>2</sub> O	ジ-tert-ブチルジカーボネート
Bn	ベンジル基
Bu <sub>3</sub> P	トリブチルフォスフィン
CDI	1, 1'-カルボニルジイミダゾール
DABT	ジハイドロキシアミノブチルタータリックアシッド
DBU	1, 8-ジアザビシクロ [5. 4. 0] ウンデカ-7-エン
DMAP	ジメチルアミノピリジン
DME	1, 2-ジメトキシエタン
DMF	ジメチルホルムアミド
EDC	1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド
Et	エチル基
Fmoc	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基
Fmoc-OSu	9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカーボネート
HOBt	1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
HyT	ヒドラジノタータリックアミド
Me	メチル基
NMP	N-メチル-2-ピロリドン
PEG	ポリエチレングリコール
Ph <sub>3</sub> P	トリフェニルフォスフィン
PyBOP	ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノーホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート
TBAF	フッ化テトラブチルアンモニウム
TBDMS	tert-ブチルジメチルシリル基
TBDMSOTf	トリフルオロメタンスルホン酸 tert-ブチルジメチルシリル基
TBDPS	tert-ブチルジフェニルシリル基
TBS	tert-ブチルジメチルシリル基
tBu	tert-ブチル基
TFA	トリフルオロ酢酸
THF	テトラヒドロフラン
TMAD	N, N, N', N'-テトラメチルアゾジカルボキサミド
TOYO-Pearl resin	TOYOパール樹脂
Tr	トリチル基
Ts	トシル基 (トルエンシルホニル基)
WSC	水溶性カルボジイミド (N-エチル-N'-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)



製法1：一般式 (I a) で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法

(1) ( $m=1$ ,  $m'=2$ ,  $m''=1$ )





式中、 $W_1 \sim W_5$ は水酸基の保護基であり、 $Y_1$ はアミノ基の保護基である。 $X_3$ は $X_3$ と同義であり、また $X_{3''}$ も $X_3$ と同義である。 $R_{5'}$ は $R_5$ と同義であり、また $R_{5''}$ も $R_5$ と同義である。またそれ以外の各記号の定義は上述の通りである。

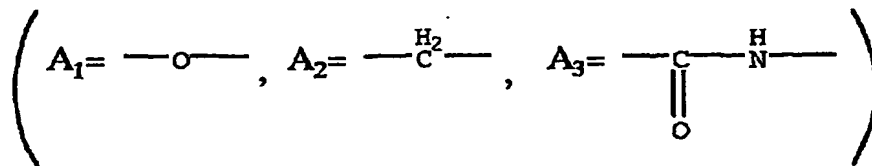
- 5 水酸基の保護基としては、当分野で通常用いられている任意の各基が用いられるが、具体的には、*tert*-ブチル基等のアルキル基；アセチル基、プロピオニル基、ピバロイル基、ベンゾイル基等のアシル基；メトキシカルボニル基、*tert*-ブトキシカルボニル基等のアルコキシカルボニル基；ベンジルオキシカルボニル基等のアラルキルオキシカルボニル基；ベンジル基、ナフチルメチル基等のアリールメチル基；トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、*tert*-ブチルジメチル
- 10

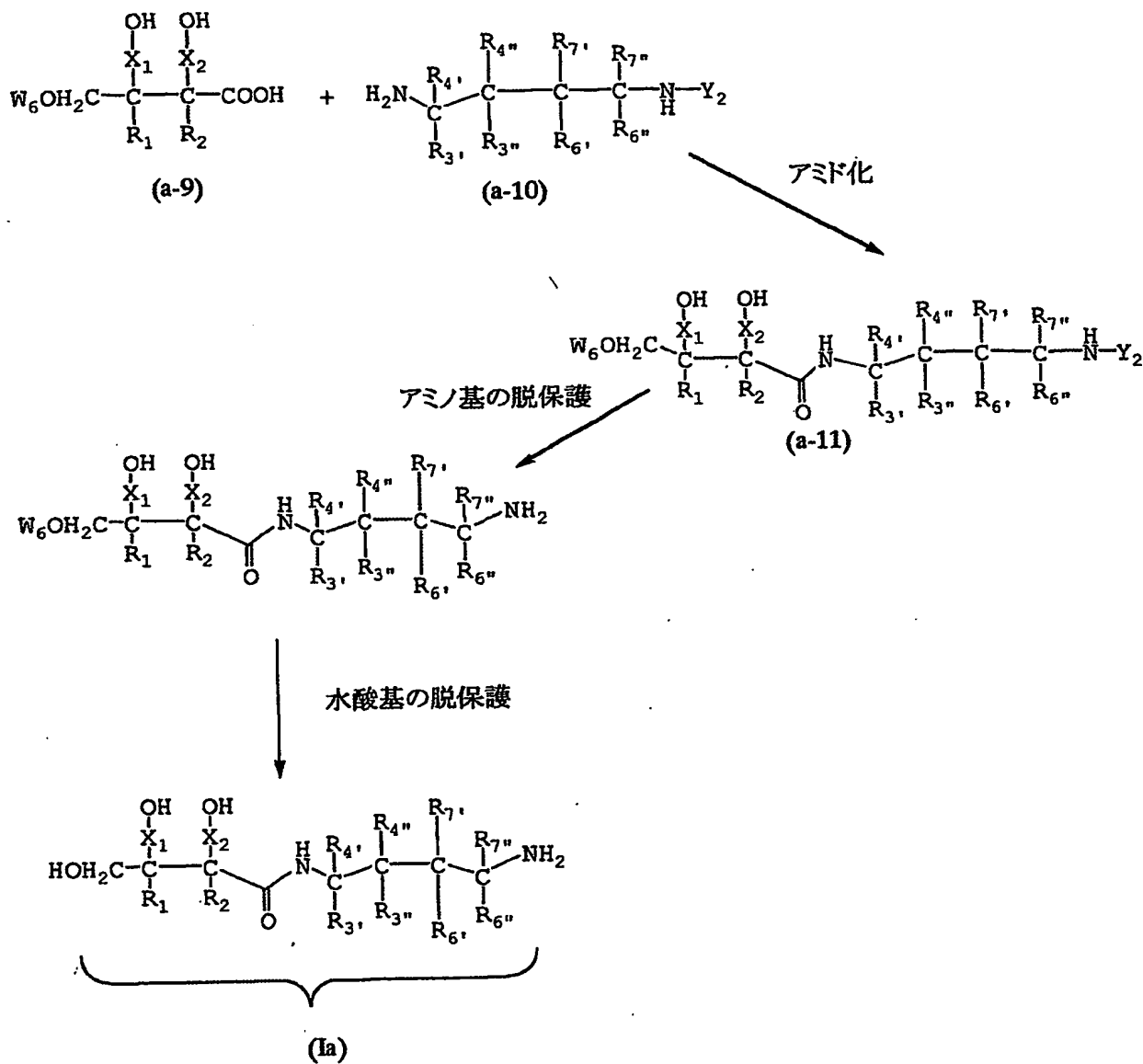
ルシリル基、tert-ブチルジフェニルシリル基等のシリル基；エトキシメチル基、メトキシメチル基等の低級アルコキシメチル基などが例示され、好ましくは、tert-ブチルジメチルシリル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、メトキシメチル基、tert-ブチル基が挙げられる。アミノ基の保護基としては、当分野で通常用いられている任意の各基が用いられるが、具体的には、tert-ブトキシカルボニル基、メトキシカルボニル基等の低級アルコキシカルボニル基；ベンジルオキシカルボニル基等のアラルキルオキシカルボニル基；ベンジル基等のアラルキル基；ペンゼンスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、メタンスルホニル基等の置換スルホニル基などが例示され、好ましくは、tert-ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基が挙げられる。

アミノ基の保護および脱保護、ならびに水酸基の保護および脱保護は使用する保護基に応じて適宜公知の方法および試薬によって実施される。

化合物 (a-4) (カルボン酸) および化合物 (a-2) (アミノ体) をアミド化によって脱水縮合する反応は、通常、等量のアミノ体とカルボン酸の存在下、1.1 当量程度の N-エチル-N'-ジメチルアミノカルボジイミド、N-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール等の縮合剤を用いて、DMF や塩化メチレン等の溶媒中で、室温下 1 時間から 10 時間程度反応させることによって行われる。

製法 2：一般式 (I, a) で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法 (2) ( $m=2$ ,  $m'=0$ ,  $m''=2$ )



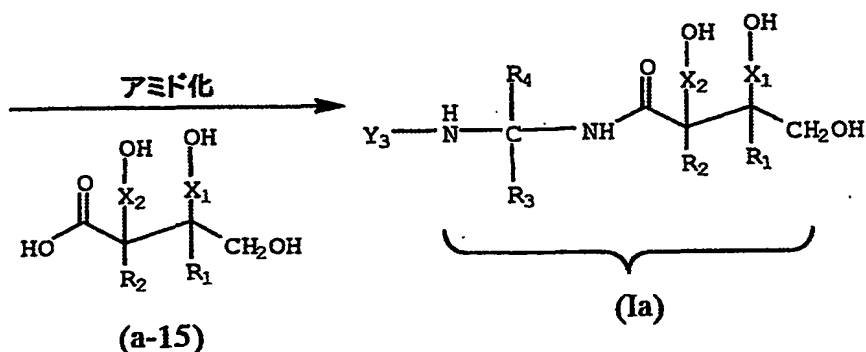
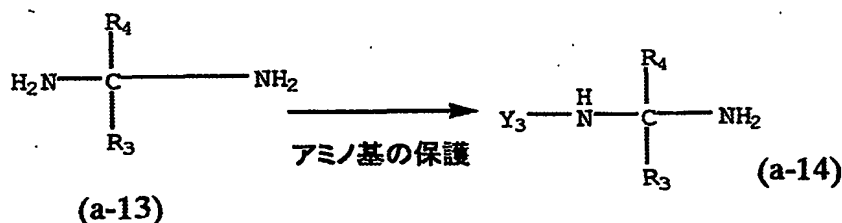
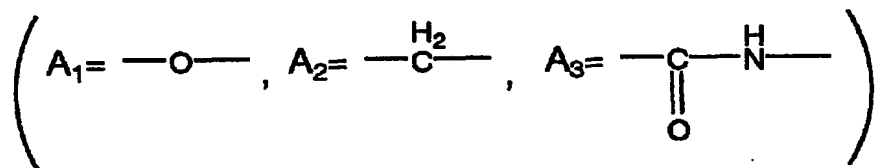


式中、 $\text{Y}_2$ はアミノ基の保護基である。 $\text{W}_6$ は水酸基の保護基である。 $\text{R}_{3'}$ は $\text{R}_3$ と同義であり、また $\text{R}_{3''}$ も $\text{R}_3$ と同義である。 $\text{R}_{4'}$ は $\text{R}_4$ と同義であり、また $\text{R}_{4''}$ も $\text{R}_4$ と同義である。 $\text{R}_{6'}$ は $\text{R}_6$ と同義であり、また $\text{R}_{6''}$ も $\text{R}_6$ と同義である。 $\text{R}_{7'}$ は $\text{R}_7$ と同義であり、また $\text{R}_{7''}$ も $\text{R}_7$ と同義である。それ以外の各記号の定義は上述の通りである。アミノ基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示される。アミノ基の脱保護は使用する保護基によって適宜公知の方法および試薬によつ

て実施される。

化合物 (a-9) (カルボン酸) および化合物 (a-10) (アミノ体) をアミド化によって脱水縮合する反応は、通常、等量のアミノ体とカルボン酸の存在下、1.1 当量程度の N-エチル-N'-ジメチルアミノカルボジイミド、および N-ヒドロキシーベンゾトリアゾール等の縮合剤を用いて、DMF や塩化メチレン等の溶媒中で、室温下 1 時間から 10 時間程度反応させることによって行われる。

製法 3 : 一般式 (I a) で表される部分構造を有する親水性スペーサーの製造方法  
(3) ( $m=1$ ,  $m'=0$ ,  $m''=0$ )



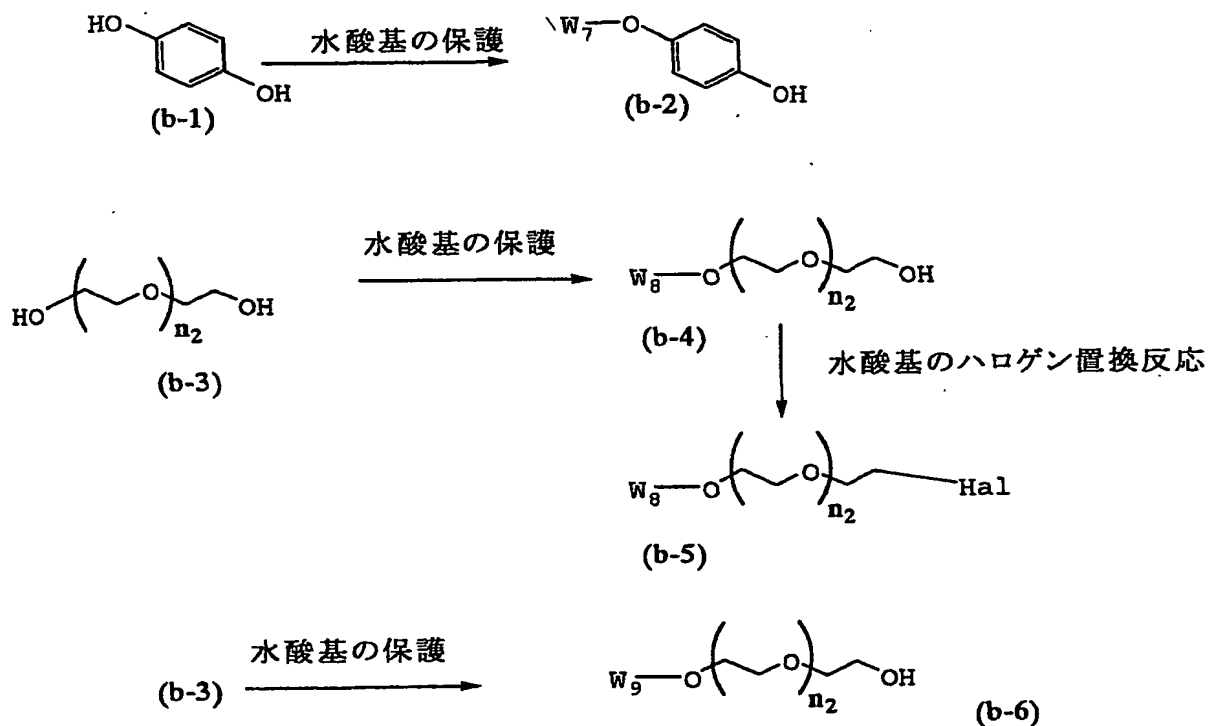
式中、 $\text{Y}_3$  はアミノ基の保護基であり、それ以外の各記号の定義は上述の通りである。アミノ基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示される。

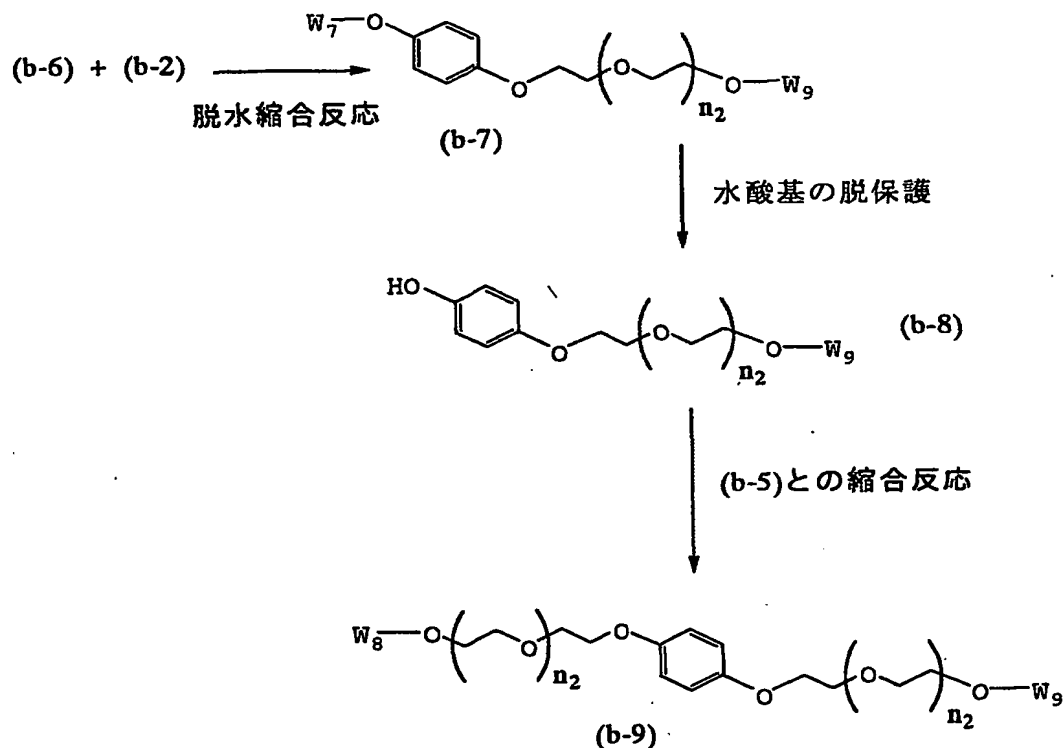
化合物 (a-14) (アミノ体) および化合物 (a-15) (カルボン酸) をアミド化によって脱水縮合する反応は、通常、等量のアミノ体とカルボン酸の存在下、

1. 1当量程度のN-エチル-N'-ジメチルアミノカルボジイミド、およびN-ヒドロキシベンゾトリアゾール等の縮合剤を用いて、DMFや塩化メチレン等の溶媒中で、室温下1時間から10時間程度反応させることによって行われる。

製法4：一般式(Ib)で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法

5  $(n-1=n'-1=n_2)$





式中、 $W_7 \sim W_9$ は水酸基の保護基であり、 $Hal$ はハロゲン原子（塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、フッ素原子）を表し、それ以外の各記号の定義は上述の通りである。水酸基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示される。尚  
 5  $n_2$ は、 $n-1$ あるいは $n'-1$ である（ $n$ 、 $n'$ は上述のとおり）。

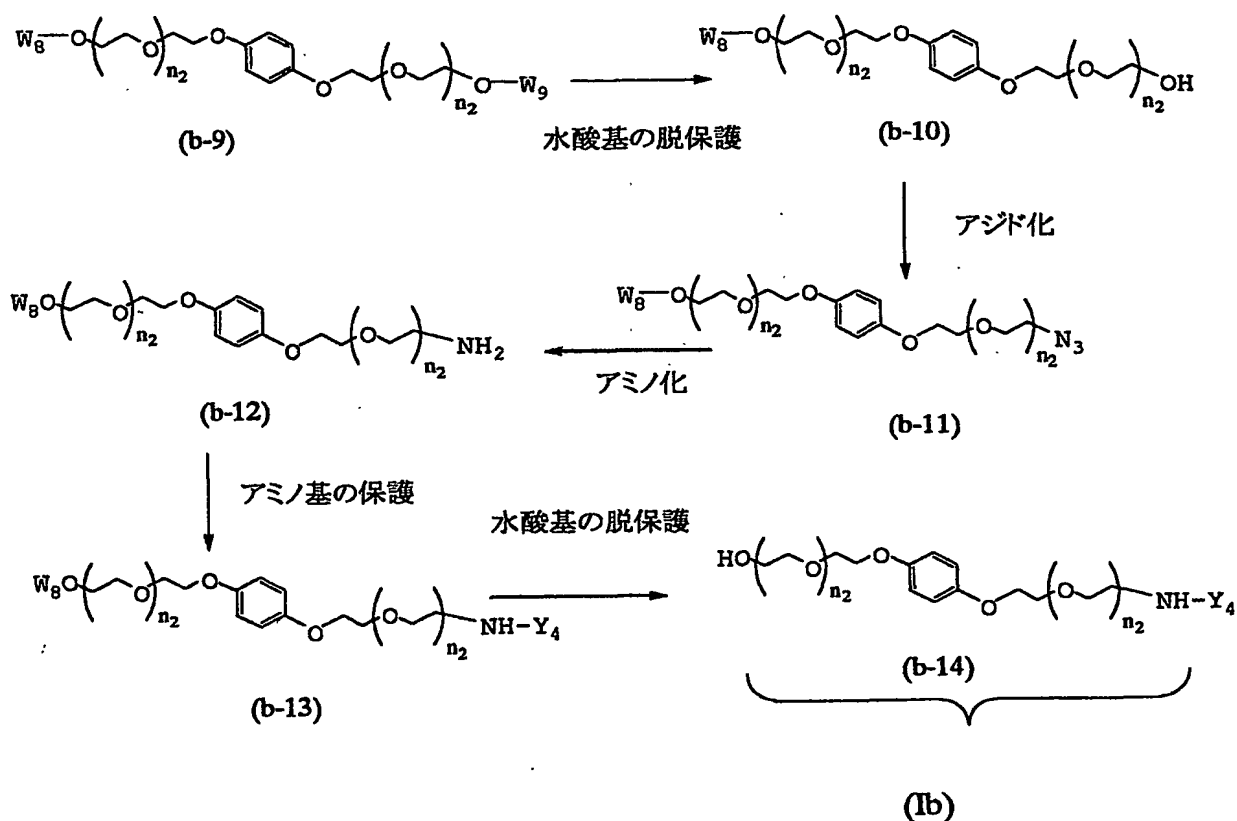
水酸基の保護、脱保護は使用する保護基によって適宜公知の方法および試薬によって実施される。

化合物（ $b-4$ ）（アルコール体）の化合物（ $b-5$ ）へのハロゲン置換反応は、通常、1当量のアルコール体に2～3当量の四臭化炭素、および1～2当量のトリフェニルホスフィン塩化メチレン等の溶媒中で、 $0^\circ\text{C}$ ～室温で、1時間から数時間反応させることによって行われる。

化合物（ $b-6$ ）（アルコール体）と化合物（ $b-2$ ）（フェノール体）との脱水縮合反応は、通常、1当量のアルコール体と1当量のトリブチルホスフィンをトルエン溶媒中室温で1時間程度反応を行い、ここに1当量のフェノール体および1，

1'-アゾビス (N, N-ジメチルホルムアミド) 等の縮合剤を加え、0～50℃で数時間から終夜で反応させることによって行われる。

5 化合物 (b-8) (フェノール体) と化合物 (b-5) (ハロゲン体) との縮合反応は、通常、0～10℃において、1当量のフェノール体と約10倍当量の過剰の水素化ナトリウムのような強塩基をTHF等の溶媒中で、10～60分程度反応させ、そこに2当量程度のハロゲン体を加え、室温下1～10時間程度反応させることによって行われる。



10 式中、 $Y_4$ はアミノ基の保護基であり、それ以外の各記号の定義は上述の通りである。水酸基の保護基およびアミノ基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示される。

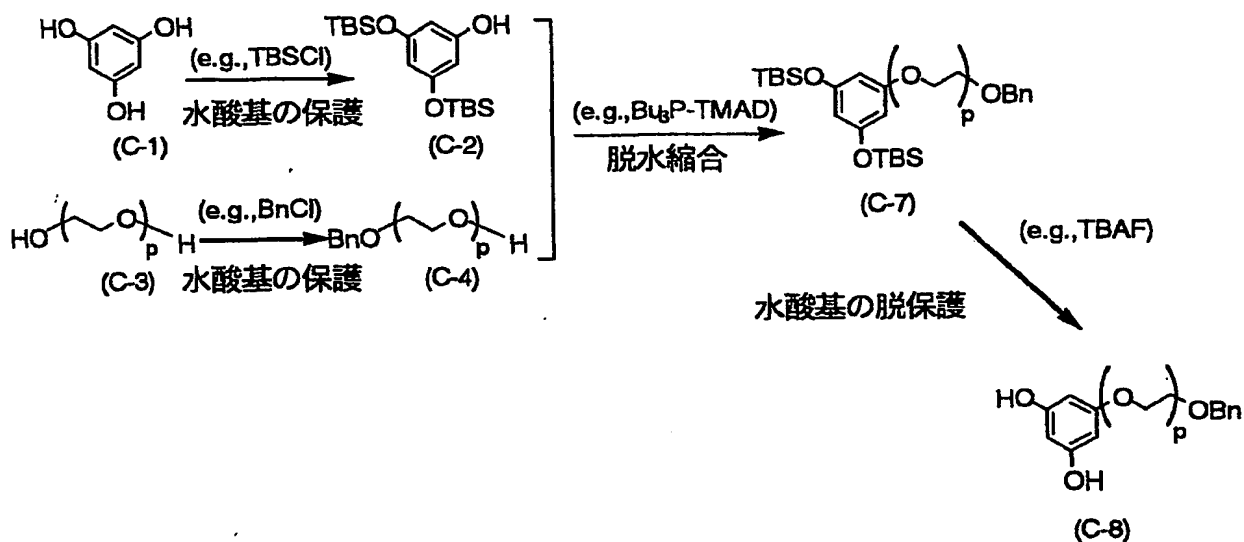
水酸基あるいはアミノ基の脱保護は使用する保護基によって適宜公知の方法および試薬によって実施される。

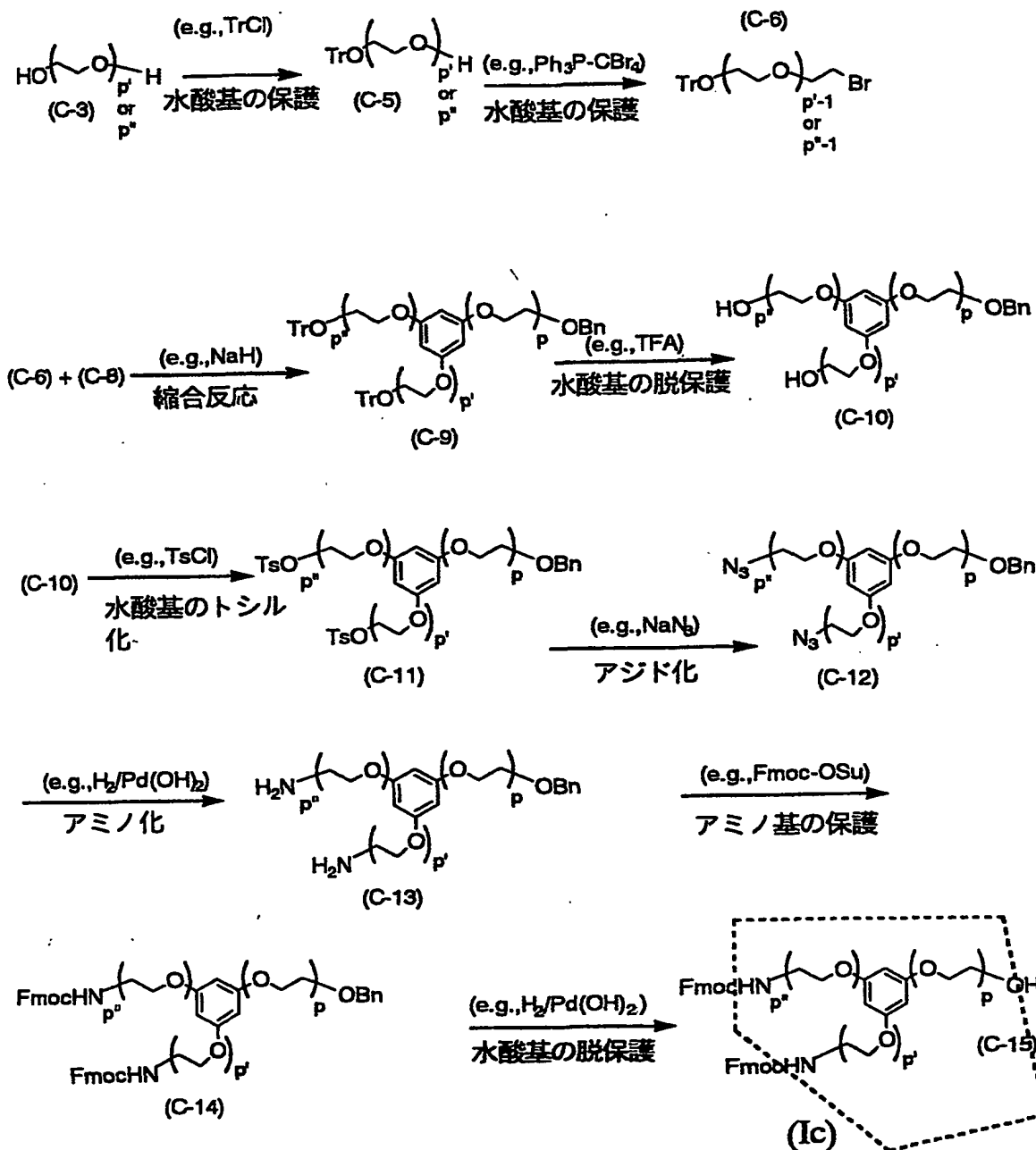


化合物 (b-10) (アルコール体) の化合物 (b-11) へのアジド化は、通常、  
1 当量のアルコール体と 1.5 当量程度の p-トルエンスルホニルクロライドおよ  
び 0.2 当量程度の 4-ジメチルアミノピリジンのような塩基をピリジン等の溶媒  
中で、30~50℃で、数時間反応させることによって得られる O-トシル体を単  
5 離し、それに約 10 倍当量程度の過剰のアジ化ナトリウムを加え、DMF 等の溶媒  
中で、50~90℃で数時間反応させることにより行われる。

化合物 (b-11) (アジド体) の化合物 (b-12) へのアミノ化は、通常、1  
当量のアジド体を、0.1 当量程度の水酸化パラジウムのような触媒を用いてメタ  
ノール等の溶媒存在下、1~数気圧の水素存在下、室温で数時間反応させること  
10 によって得られる。

製法 5：一般式 (Ic) で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法  
各構造式中、特定の基、特定の化合物を記載する場合があるが、それらは一例で  
あって、特に限定されるものではない。同等の働きを有するものであれば適宜変更  
し得る。





式中、各記号の定義は上述の通りである。式中の水酸基の保護基、アミノ基の保護基、カルボキシル基の保護基はその一例を示したものであって、それ以外にも通常当分野で用いられる任意の各基が用いられる。具体的には上記したものと同様なものが例示される。アミノ基の保護、カルボキシル基の脱保護、および水酸基の保

護ならびに脱保護の方法は、本明細書に記載する以外にも、使用する保護基に応じて適宜公知の方法および試薬によって実施され得ることは当業者には明らかであろう。

化合物(c-1)(フェノール体)の化合物(c-2)への水酸基の保護は、例えば保護基としてTBSを使用する場合には、通常、1当量のフェノール体、3当量程度の塩基(例えばイミダゾール)および2当量程度のシリルクロライドを、DMF等の溶媒中で、室温で10時間程度反応させることによって行われる。

化合物(c-2)(フェノール体)と化合物(c-4)(アルコール体)との脱水縮合反応は、通常、1当量のアルコール体と1当量のトリブチルホスフィンとをトルエン溶媒中室温で1時間程度反応を行い、ここに1.3当量のフェノール体および1.3当量の1,1'-アゾビス(N,N-ジメチルホルムアミド)等の縮合剤を加え、室温で数時間から終夜反応させることによって行われる。

化合物(c-7)(フェノール保護体)の化合物(c-8)への水酸基の脱保護は、通常、1当量のフェノールの保護体(例えばシリル保護体)、1.2当量程度のテトラブチルアンモニウムフルオライドをTHF等の溶媒中で、室温で1時間程度反応させることによって行う。

化合物(c-8)(フェノール体)と化合物(c-6)(ハロゲン化物)との縮合反応は、通常、室温で1当量のフェノール体と約5.2当量の過剰の水素化ナトリウムのような強塩基をTHFやDMF等の溶媒中で、10~60分程度反応させ、そこに4当量程度のハロゲン化物(例えばアルキルブロマイド)を加え、室温で約4時間程度反応させることによって行われる。この縮合反応によって化合物(c-9)が得られる。

化合物(c-9)(フェノール保護体)の化合物(c-10)(アルコール体)への水酸基の脱保護は、通常、1当量のフェノール保護体(例えばトリチル保護体)を、TFAを含む塩化メチレン等の溶媒中で、室温で約1時間程度反応させることによって行われる。

化合物(c-10)(アルコール体)の化合物(c-11)への水酸基のトシル化

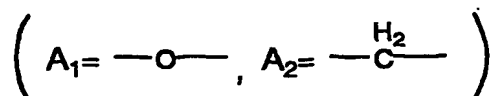
反応は、例えば保護基としてTsを使用する場合には、通常、1当量のアルコール体、触媒量のDMAF等の塩基、約6当量のトシルクロライドを、ピリジン等の溶媒中で、室温～40℃で約2時間程度反応させることによって行われる。

5 化合物(c-11)(トシル体)の化合物(c-12)へのアジド化は、1当量のトシル体、約15当量のアジ化ナトリウムを、DMF等の溶媒中で、約60℃、約2時間程度反応させることによって行われる。

10 化合物(c-12)(フェノール保護体)の化合物(c-13)へのアミノ化および、化合物(c-14)へのアミノ基の保護基の導入は、通常、1当量のフェノール保護体(ベンジル保護体)、触媒量の水酸化パラジウムを水素ガス雰囲気下、メタノール等の溶媒中で、室温で約1時間程度反応させることによって得られるアミン体(c-13)に、約0.84当量の炭酸9-フルオレニルメチルスクシンイミジル、約1.5当量のトリエチルアミンのような塩基を加え、THF等の溶媒中で、室温で約1時間程度反応させることによって行われる。

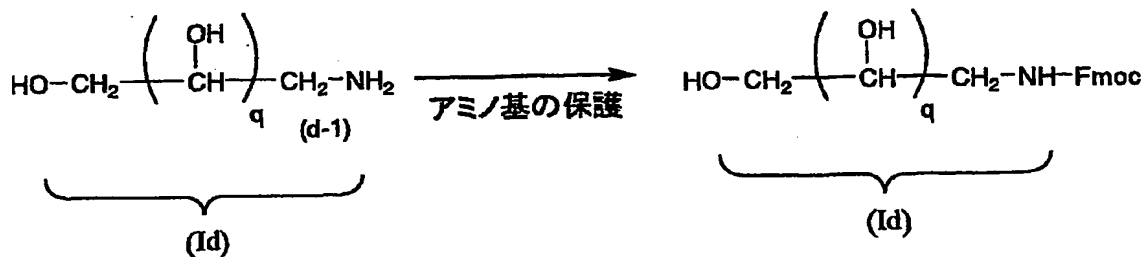
15 化合物(c-14)(水酸基保護体)の化合物(c-15)への水酸基の脱保護は、通常、1当量の水酸基保護体(例えばベンジル保護体)を0.1当量程度の水酸化パラジウムのような触媒を用いてメタノール等の溶媒存在下、1～数気圧の水素存在下、室温で数時間反応させることによって得られる。

製法6：一般式(I,d)で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法  
( $R_{10}=R_9$ =水素原子,  $R_8$ =水素原子,  $X_4$ =単結合)



20

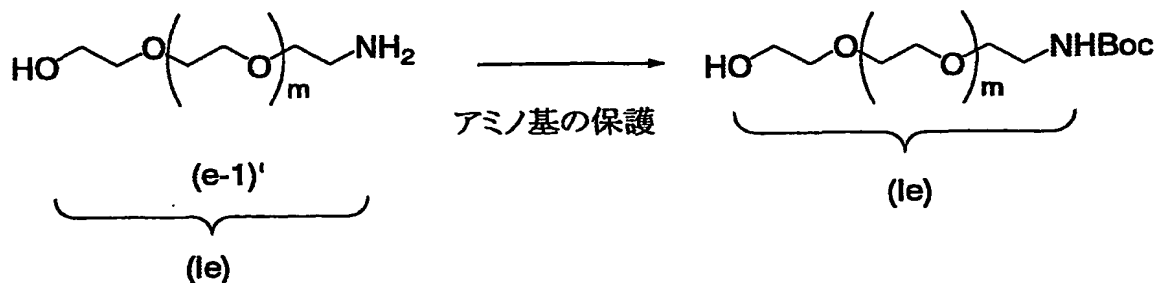
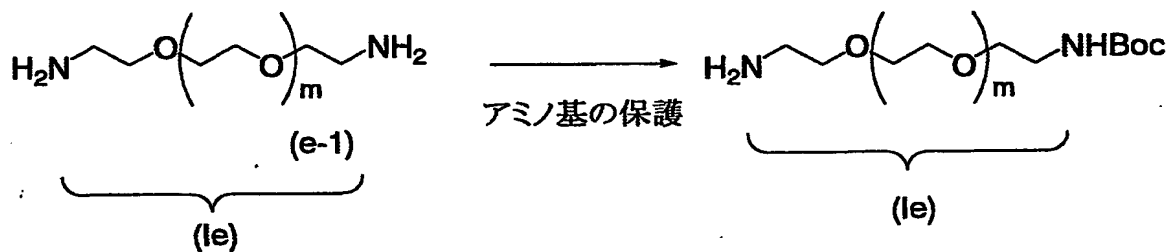
各構造式中、特定の基、特定の化合物を記載する場合があるが、それらは一例であって、特に限定されるものではない。同等の働きを有するものであれば適宜変更し得る。尚、下記式(d-1)は商業的に入手可能である。



式中、各記号の定義は上述の通りである。式中のアミノ基の保護基はその一例を示したものであって、それ以外にも通常当分野で用いられる任意の各基が用いられる。具体的には上記したものと同様なものが例示される。アミノ基の保護の方法は、  
5 使用する保護基に応じて適宜公知の方法および試薬によって実施され得る。

製法7：一般式(I e)で表される部分構造を有する親水性スペーサーの製造方法

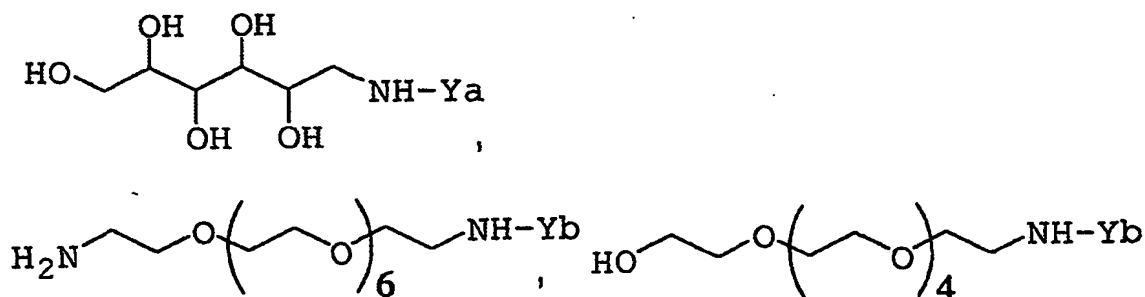
各構造式中、特定の基、特定の化合物を記載する場合があるが、それらは一例であって、特に限定されるものではない。同等の働きを有するものであれば適宜変更し得る。尚、下記式(e-1)および(e-1)'は商業的に入手可能である。



式中、各記号の定義は上述の通りである。式中のアミノ基の保護基はその一例を

示したものであって、それ以外にも通常当分野で用いられる任意の各基が用いられる。具体的には上記したものと同様なものが例示される。アミノ基の保護の方法は、使用する保護基に応じて適宜公知の方法および試薬によって実施され得る。

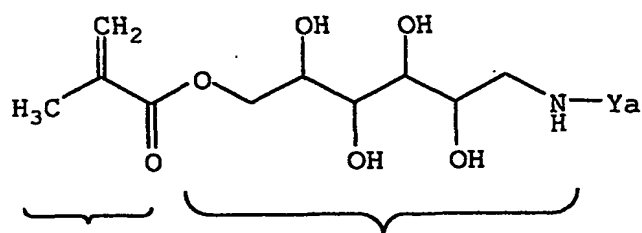
5 本発明の樹脂を製造するにあたり使用される親水性スペーサーとして好ましくは、式 (I d) または式 (I e) で表される部分構造を少なくとも1つ有するものであって、特に式 (I d) においては、 $A_1$  が  $-O-$  であり、 $A_2$  が低級アルキレン基 (特にメチレン基) であり、複数個存在する  $X_4$  が同一で単結合であり、 $q$  が4であり、複数個存在する  $R_8$  が同一で水素原子であり、 $R_9$  および  $R_{10}$  が水素原子である親水性スペーサーが好適である。より具体的には下記式



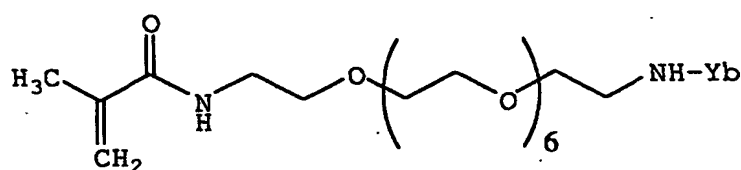
10

(式中、 $Y a$  および  $Y b$  は水素原子またはアミノ保護基である) で表される化合物を上記したモノマー (好ましくは (メタ) アクリル系モノマー) に組み込んでなる親水性モノマーの重合体を含む樹脂が本発明において好適に使用される。

15 親水性スペーサーを組み込んだモノマー (すなわち親水性モノマー) としては、例えば以下のような化合物が例示される。

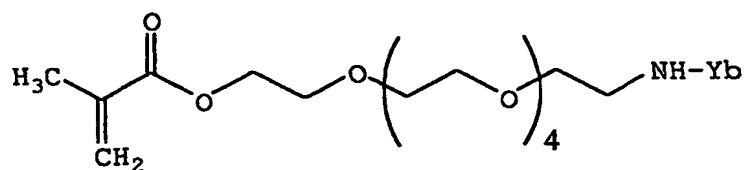


モノマー由来 親水性スペーサー由来



モノマー由来

親水性スペーサー由来



モノマー由来

親水性スペーサー由来

(式中Y a およびY b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

本発明の樹脂は本発明の親水性モノマーを重合することによって得られる、重合方法としては、例えば、溶液重合、エマルジョン重合、分散重合、懸濁重合、固相重合（高分子学会編、「高分子科学実験法」東京化学同人、ISBN 4-8079-0180）などが挙げられる。これらの重合方法においては、通常知られる添加剤を用いてもよい。例えば、重合開始剤として、過酸化ベンゾイルおよびtert

ーブチルヒドロペルオキシド等の有機過酸化物、ならびにアゾビスイソブチロニトリル等のアゾ化合物などが挙げられる。エマルジョン重合の場合は、さらに界面活性剤が必要となり、例えば、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン誘導体、ポリオキシエチレンアルキルアミン、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル等）、陰イオン界面活性剤（例えば、脂肪酸塩、アルキルリン酸塩、アルキル硫酸エステル塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキルナフタレンスルホン酸塩、アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸塩等）等が挙げられ、これらを併用しても良い。懸濁重合の場合にはさらに分散安定剤を添加してもよいが、分散安定剤の例としてはポリビニルアルコールおよびポリアクリル酸塩のような水溶性高分子化合物が挙げられる。又、必要に応じてグリセロール ジメタクリレート（CAS＝[1830-78-0]）、トリエチレングリコール ジメタクリレート（CAS＝[109-17-1]）やパラジビニルベンゼン（CAS＝[1321-74-0]）等の架橋剤を添加する。

懸濁重合や分散重合等、通常有機相と水相等の多相状態で重合を行う場合、使用する親水性モノマーの種類、特にあらかじめ導入している親水スパーサーの種類に応じて有機溶媒を適宜検討・選択する必要があるが、以下の要件を満たす有機溶媒を用いることが好ましい。

- ・ 水不溶性である。
- ・ 親水性モノマーを溶かし得る。
- ・ 沸点が70℃以上である。

重合反応に付す各成分として親水性モノマーの他に、例えば重合開始剤および架橋剤を用いる場合には、その割合は、親水性モノマー100重量部に対して、重合開始剤を通常0.1%～10%重量部、好ましくは1%～3%重量部、架橋剤を通常1%～20%重量部、好ましくは1%～5%重量部混ぜる。また20%以上の架橋剤の添加も好ましく、通常90%程度迄の架橋剤を添加し得る。重合反応の諸条件は、利用する重合反応の種類等によっても異なるが、いずれも当分野で公知であ



り、例えば窒素ガス等の不活性ガスでパージした後、上記各成分の混合物を、温度を70～100℃に加熱して、通常3～10時間かけて実施する（高分子学会編、「高分子科学実験法」東京化学同人、ISBN 4-8079-0180）。

5 親水性モノマー、重合開始剤および架橋剤に加え、必要に応じて、着色剤、紫外線吸収剤、熱安定剤、重合禁止剤、帯電防止剤、充てん剤等の添加剤を添加することができる。

10 又、親水性モノマーの重合により得られる樹脂について、その表面の過剰な遊離アミノ基により生じる過剰なリガンド結合が結果的に樹脂の物性を変えてしまうような場合、リガンドとの結合性を低減させるために、遊離のアミノ基に対してアセチルキャッピング等の処理を施してもよい。

本発明の樹脂は、親水性モノマーの重合体のみで構成されるものであってもよいが、上記した通り、過剰なリガンド結合を防ぐ目的で、遊離アミノ基を有さないモノマーを一定量混合させて得られるモノマー混合物の重合体であってもよい。そのようなモノマーとしては、当分野で通常使用されている樹脂原料となる種々のモノマー化合物が挙げられる。好ましくは、化学的安定性ならびに物理的安定性に優れた樹脂を合成し得る（メタ）アクリル系のモノマーである。（メタ）アクリル系のモノマーの例としては、メチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、プロピル（メタ）アクリレート、ブチル（メタ）アクリレート、2-エチルヘキシル（メタ）アクリレート、ラウリル（メタ）アクリレート、ステアリル（メタ）アクリレート、シクロヘキシル（メタ）アクリレート、2-ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、2-プロピル（メタ）アクリレート、クロロ-2-ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、ジエチレングリコールモノ（メタ）アクリレート、メトキシエチル（メタ）アクリレート、グリシジル（メタ）アクリレート、ジシクロペンタニル（メタ）アクリレート、ジシクロペンテニル（メタ）アクリレートおよび  
25 イソボルニル（メタ）アクリレート等を挙げることができる。

さらに親水性モノマーについても同じ種類の親水性モノマー（すなわち導入されている親水性スペーサーが同じ）であってもよいし、異なる種類の複数の親水性モノ

ノマーの混合物（すなわち導入された親水スペーサーが異なるモノマーの混合物）であってもよい。

本発明の樹脂は、親水性スペーサーの導入により、樹脂表面（以下固相表面ともいう）の疎水性の程度が低減化されている。従って、タンパク質等の当該樹脂への非特異的な吸着が極めて抑制されている。このような効果は、本発明の樹脂を、分子間の特異的相互作用の解析やリガンドのターゲット分子の同定等への利用に好適なものとしている。すなわち、本発明の樹脂はアフィニティークロマトグラフィー用の担体として有用である。アフィニティークロマトグラフィーにおいては、本発明の樹脂、すなわち本発明の担体にそのターゲット分子を同定することを所望とする、あるいはそのターゲット分子との特異的相互作用を解析することを所望とする分子（以下、リガンドともいう）を固定化する。尚、本明細書中、リガンドならびにターゲット分子という用語は、互いに特異的な分子間相互作用を有する組み合わせを意図するものであって、当該組み合わせのうち、片方をリガンドとして固相に固定化すれば他方がターゲット分子となり、すなわちどちらを固相に固定化するかによって、それらの呼称は変更され得る。

「特異的な相互作用」とは、特定のリガンド（特定のターゲット分子）のみを特異的に認識して結合するような特性を発揮する作用であり、アゴニストあるいはアンタゴニストに対する特異的受容体、基質に対する酵素、そして例えばFK506（リガンド）に対するFK506結合タンパク質（ターゲット分子）や、ステロイドホルモンに対するステロイドホルモン受容体（例＝*dexamethason*と*glucocorticoid receptor*）、抗癌剤*trapoxin*に対するHDAC等の関係が「特異的な相互作用」に該当する。一方、「非特異的な相互作用」とは、それによる結合の対象が広範にわたり且つ特定分子に限定されず、反応条件によって種々変化するような状況を生じる作用をいい、本発明においては、担体上のリガンドや担体表面に、結合・吸着するような不特定の分子との間の作用を意味する。「非特異的な相互作用」は、「特異的な相互作用」に基づくリガンドとターゲット分子の結合の障害となるか、あるいは混同されることにより「特異的な

相互作用」による結合を見落としてしまう危険性がある。

本発明において「特異的な相互作用を解析する」とは、リガンドとターゲット分子との間の相互作用の特異性の程度を、相互作用情報として得ることであって、例えば $K_d$ 、 $K_a$ 等の数値として得ることができる。本発明において「選別」とは、  
5 上記相互作用情報に基づき、リガンドと特異的な相互作用を有するか否かを判定し、ターゲット分子を同定することを意味する。

リガンドの樹脂への固定化は、リガンドと樹脂表面に存在する親水性スぺーサーとの結合による。固定化するリガンドによっては、あらかじめ親水性スぺーサーとの結合を容易にするためのリンカーを導入しておくこともまた好適である。リガ  
10 ドが担体に固定化されたか否かは、リガンド、あるいはリガンドに予め結合・導入された任意の基に含まれるある特定の構造乃至置換基等に基づく呈色反応等を利用して確認することができる。例えばアミノ基を認識するニンヒドリン反応等が利用できる。結合は、通常当分野で実施される反応を利用して実施される。簡便且つ確  
15 実な手段としてアミド結合形成反応を利用する方法が挙げられる。本反応は、例えば「ペプチド合成の基礎と実験」(ISBN 4-621-02962-2、丸善、昭和60年初版)に従って実施できる。各反応に用いられる試薬や溶媒については当分野で通常用いられるものが利用でき、採用する結合反応によって適宜選択される。

本発明において樹脂表面に固定化されるリガンドは特に限定されず、公知の化合物であって  
20 も今後開発される新規な化合物であってもよい。また、低分子化合物であっても高分子化合物であってもかまわない。ここで低分子化合物とは分子量1000未満程度の化合物であって、例えば医薬品として通常使用し得る有機化合物およびその誘導体や無機化合物が挙げられ、有機合成法等を駆使して製造される化合物やその誘導体、天然由来の化合物やその誘導体、プロモーター等の小さな核酸分  
25 子や各種の金属等であり、望ましくは医薬品として使用し得る有機化合物およびその誘導体、核酸分子をいう。また、高分子化合物としては分子量1000以上程度の化合物であって、タンパク質、ポリ核酸類、多糖類、およびこれらを組み合わせ

たものなどが挙げられ、望ましくはタンパク質である。これらの低分子化合物あるいは高分子化合物は、公知のものであれば商業的に入手可能であるか、各報告文献に従って採取、製造、精製等の工程を経て得ることができる。これらは、天然由来であっても、また遺伝子工学的に調製されるものであってもよく、また半合成等によっても得ることができる。

本発明の樹脂は、アフィニティークロマトグラフィー用の固相担体としてリガンドを固定化した固相担体上で該リガンドとの特異的な相互作用に基づいてターゲット分子を選別する為に使用することが可能であり、また有用である（以下、当該アフィニティークロマトグラフィー用の固相担体を本発明の固相担体ともいう）。従ってターゲット分子は、リガンドと特異的に相互作用するものであれば特に限定されるものではなく、公知化合物である場合もあれば新規物質である場合も予想される。ターゲット分子としては低分子化合物であっても高分子化合物であってもかまわない。

リガンドとターゲット分子との相互作用の解析、ならびにターゲット分子の選別は簡便には本発明の固相担体上で行う。ターゲット分子として予め候補物質が予測される場合には、候補物質を単独で固相担体上のリガンドと接触させ両者の相互作用を測定し、候補物質が該リガンドのターゲット分子であるか否かを判断すればよいが、通常、複数の物質（高分子化合物および／または低分子化合物）を含む試料をリガンドと接触させ、複数の物質（高分子化合物および／または低分子化合物）の各々とリガンドとの相互作用の有無ならびにその相互作用の程度を測定することによりターゲット分子であるか否かを判断し、選別する。ここで複数の物質を含む試料としては、全て公知化合物から構成されるものであっても、一部新規な化合物を含むものであっても、さらには全て新規な化合物から構成されるものであってもよい。しかしながら、リガンドのターゲット分子の探索、あるいは昨今のプロテオーム解析の進歩によれば、全てその構造が公知な化合物の混合物であることが望ましい。全て公知な化合物から構成される試料としては、大腸菌等によって遺伝子工学的に調製された精製タンパク質の混合物等であり、一部新規な化合物を含むもの

としては、細胞や組織の抽出物 (L y s a t e) であり、また全て新規な化合物から構成されるものとしては、まだその機能や構造が知られていない新規なタンパク質や新しく合成された化合物等の混合物が挙げられる。試料が混合物の場合、特に公知化合物を含む場合には、任意にこれらの化合物の試料中の含有量を所望の値に設定しておくこともできる。リガンドのターゲット分子の探索という見地にたてば、選別すべき分子は、低分子化合物ならびに高分子化合物であるのが好ましく、ヒト等の動物体内でのターゲット分子の探索についていえば高分子化合物であることが好ましい。

本発明の固相担体はまた、当該固相担体上に固定化されているリガンドに特異的な相互作用を有するターゲット分子をスクリーニングする為に使用することが可能であり、また有用である。該スクリーニング方法は具体的には以下の工程を少なくとも含む。

(1) 試料を、本発明の固相担体と接触させる工程。

本工程において用いる試料は、上記同様、複数の物質を含み得るものである。その態様は特に限定されず、固相担体との接触や後の工程 (2) で実施する同定あるいは解析にどのような原理や手段、方法を用いるかによって適宜変更し得る。例えば本発明の樹脂 (固相担体) を充填したカラムを用いる場合には試料は液状とするのが好ましい。該試料と本発明のリガンド固定化固相担体とを接触させる方法は、ターゲット分子が試料中に存在する場合にリガンド固定化固相担体上でリガンドとターゲット分子が特異的相互作用によって結合することができれば特に限定されず、後の工程 (2) でどのような原理や手段、方法を用いるかによって適宜変更し得る。例えばリガンド固定化固相担体としてリガンドが固定化された本発明の樹脂を充填したカラムを用いる場合には、液状にした試料をカラムに添加しカラム内を通すことにより簡便に実施される (カラム法)。また、簡便には当該樹脂と試料とを一定時間混合することによって実施できる (バッチ法)。カラムへのアプライ量、流速、溶出処理、混合時間等はアフィニティークロマトグラフィーで通常行われている条件に基づいて実施する。

(2) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を同定し、解析する工程。

かかる工程は、固定化したリガンドの種類等によって適宜変更し得るが、通常当分野で実施されている低分子化合物あるいは高分子化合物を同定する為の各種方法により行う。また、今後開発されるであろう方法によっても実施可能であろう。例えばリガンド固定化固相担体としてリガンドが固定化された本発明の樹脂を充填してなるカラムを用いた場合、固相担体上のリガンドに結合したターゲット分子を緩衝液の極性を変える、あるいは過剰のリガンドをさらに加える等の処理によって固相担体上のリガンドから解離させ、その後同定したり、あるいは固相上のリガンドと結合した状態でそのまま界面活性剤等によって抽出して同定したりすることもできる。同定方法としては具体的には電気泳動法、免疫学的反応を用いたイムノブロッティングや免疫沈降法、クロマトグラフィー、マススペクトラム、アミノ酸シーケンス、NMR（低分子のときに特に）等の公知の手法により、またこれらの方法を組み合わせて実施する。リガンドに結合しない分子を同定する工程も上記リガンドに結合する分子を同定する方法に準じて行うことができるが、カラムの素通り画分に含まれる分子を同定の対象とするので、同定工程に入る前に予め濃縮や粗精製等の処理を行うことが好ましい。得られたデータならびに既存の報告をもとに各分子を同定し、ターゲット分子であるか否かを判断する。

また、本工程は自動化されていてもよい。例えば2次元電気泳動で得られた種々の分子のデータを直接読み取り、既存のデータベースに基づいて分子の同定を行うことも可能である。

上記したスクリーニング方法と同様な原理で、試料中のターゲット分子を測定することができる。ここで「測定」とは、試料中に存在するか否か、存在する場合にはその量、あるいはその性状の変化等、種々の操作が包含される。かかる測定により、当該ターゲット分子あるいはリガンドが関与すると考えられている疾患の診断が可能になる。かかる診断としては、癌マーカーの検出等が例示される。本発明の方法を用いることにより、特定のタンパク質（試料中のターゲット分子）が濃縮さ

れ、結果、ノイズが低減されるので、より正確な微量なターゲット分子の検出が可能である。本発明は親水性スペーサーが組み込まれたモノマーを重合してなる樹脂の任意の用途を包含する。

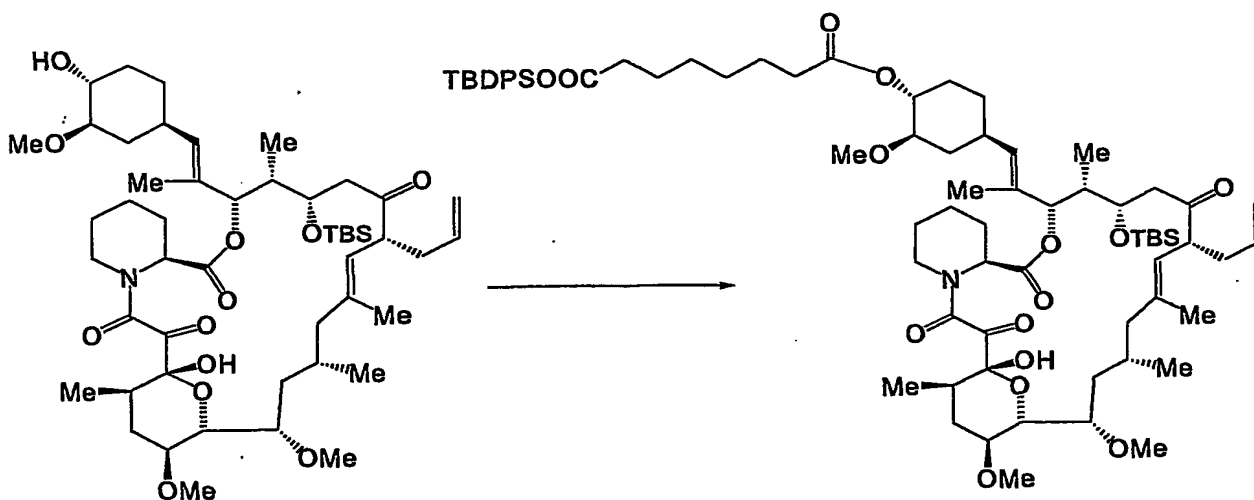
### 実施例

- 5 以下、製造例及び実験例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によりなんら限定されるものではない。また、用いる各化合物や試薬等は特に言及しない限り、商業的に入手可能であるか、また既知の報告等に基づいて調製することができる。

本製造例中の架橋剤の濃度は下記式から算出されるものである。

10 架橋剤濃度 (%) = 架橋剤のモル数 / モノマーのモル数 × 100

製造例 1 : 17-アリル-14-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ-カルボニル)ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23,25-ジメトキシ-13,19,21,27-テトラメチル-11,28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[22.3.1.0<sup>4,9</sup>]オクタコス-18-エン-2,3,10,16-テトラオンの合成



17-アリル-14-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-[2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-シクロヘキシル)-

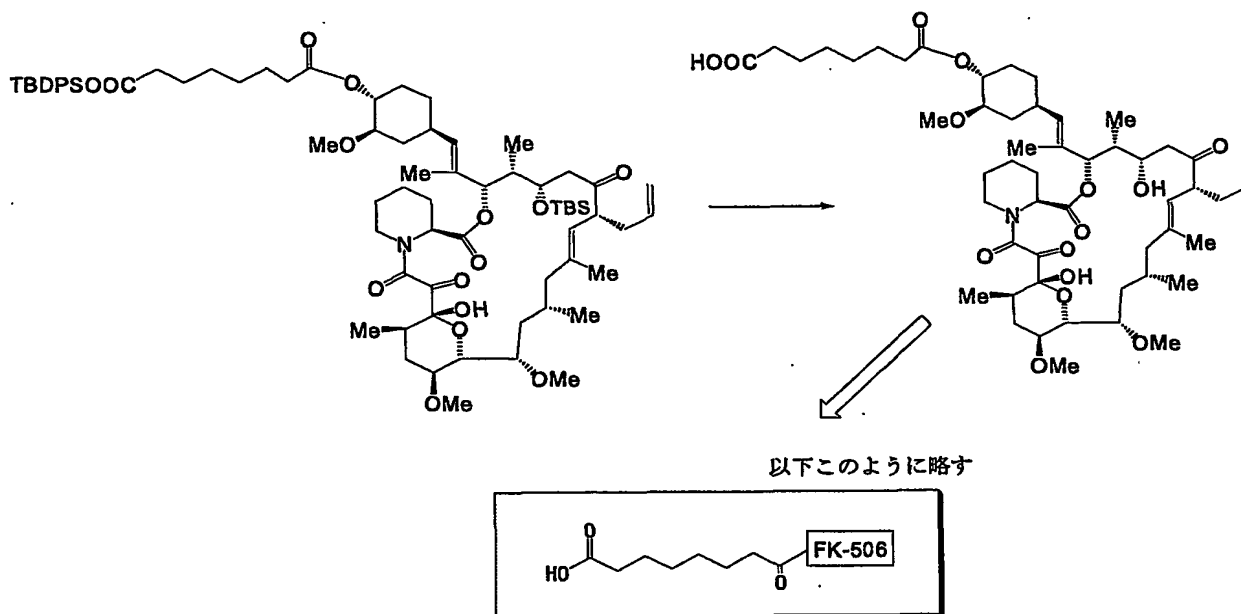
1-メチルービニル]-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチルー11, 28-ジオキサ-4-アザートリシクロ[22.3.1.0<sup>4,9</sup>]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン(138mg, 0.15mmol)、O-モノ(*tert*-ブチルージメチルーシラニル)オクタン二酸(86.7mg, 0.218mmol)、ジメチルアミノピリジン(DMAP; 16.5mg, 0.098mmol)、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC/HCl; 69.1mg, 0.261mmol)および塩化メチレン(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 1ml)の混合物を室温で1.5時間攪拌した。反応物を酢酸エチルー水混合液に注ぎ、抽出した。得られた有機層を水、食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウム(MgSO<sub>4</sub>)で乾燥した。MgSO<sub>4</sub>を濾別後、減圧下濃縮した。こうして得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し(20%AcOEt (n-ヘキサン中)で溶出)、目的とする17-アリルー14-(*tert*-ブチルージメチルーシラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-(*tert*-ブチルージメチルーシラニルオキシ-カルボニル)ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチルービニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチルー11, 28-ジオキサ-4-アザートリシクロ[22.3.1.0<sup>4,9</sup>]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン(4.4mg, 24.6%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: -0.1-0.1 (12H, m), 0.7-2.6 (47H, m), 0.85 and 0.86 (18H, s), 1.50 (3H, s), 1.63 (3H, s), 2.75 (1H, m), 3.31 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.39 (3H, s), 4.05 (1H, m), 3.0-4.4 (6H), 4.5-5.8 (9H, m).

製造例2: 17-アリルー1, 14-ジヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシ-ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチルービニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチルー11, 28-ジオキサ-4-アザートリシクロ[22.3.1.0<sup>4,9</sup>]オクタコ



## スー１８－エン－２，３，１０，１６－テトラオンの合成



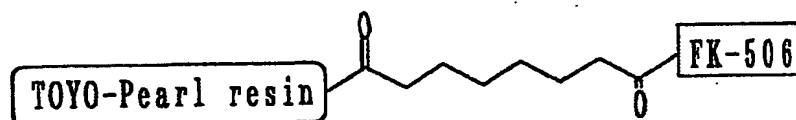
製造例１で調製した１７－アリル－１４－（*tert*－ブチル－ジメチル－シラ  
 ニルオキシ）－１－ヒドロキシ－１２－〔２－〔４－（７－（*tert*－ブチル－  
 5 ジメチル－シラニルオキシ－カルボニル）ヘプタノイル－オキシ）－３－メトキシ  
 －シクロヘキシル〕－１－メチル－ビニル〕－２３，２５－ジメトキシ－１３，１  
 9，２１，２７－テトラメチル－１１，２８－ジオキサ－４－アザトリシクロ〔２  
 2．３．１．０<sup>4，9</sup>〕オクタコス－１８－エン－２，３，１０，１６－テトラオン（４  
 4mg，０．０３７mmol）とアセトニトリル（０．８８ml）の混合物に４６  
 10 －４８％のフッ化水素（HF）水（０．１２ml）を静かに加え室温にて終夜攪拌  
 した。反応物を酢酸エチル－水混合液に注ぎ、抽出した。得られた有機層を水、食  
 塩水で洗浄後、硫酸マグネシウム（MgSO<sub>4</sub>）で乾燥した。MgSO<sub>4</sub>を濾別後、  
 減圧下濃縮した。こうして得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し（５％メタノ  
 ール（クロロホルム中）、目的とする１７－アリル－１，１４－ジヒドロキシ－１  
 15 ２－〔２－〔４－（７－カルボキシ－ヘプタノイル－オキシ）－３－メトキシ－シ  
 クロヘキシル〕－１－メチル－ビニル〕－２３，２５－ジメトキシ－１３，１９，  
 ２１，２７－テトラメチル－１１，２８－ジオキサ－４－アザトリシクロ〔２２．

3. 1. 0<sup>4, 9</sup>] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (14. 2mg, 40%) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0. 7-2. 6 (47H, m), 1. 50 (3H, s), 1. 63 (3H, s), 2. 75 (1H, m), 3. 31 (3H, s), 3. 35 (3H, s), 3. 39 (3H, s), 4. 05 (1H, m), 3. 0-4. 4 (6H), 4. 5-5. 8 (11H, m).

MS (m/z): 960 (M<sup>+</sup>)

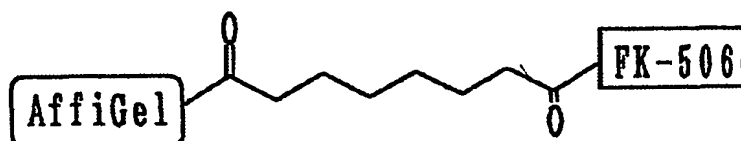
製造例3: FK506付TOYOパール樹脂 (TSKgel AF-amino) の合成



製造例2で調製した17-アシル-1, 14-ジヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシ-ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ [22. 3. 1. 0<sup>4, 9</sup>] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (38. 4mg, 0. 04mmol)、TOYOパール樹脂 (TSKgel AF-amino, 100μl, 遊離アミノ基 (available amino group) は0. 01mmol)、EDC/HCl (9. 2mg, 0. 048mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt; 6. 5mg, 0. 048mmol) およびジメチルホルムアミド (DMF; 1ml) の混合物を室温で6時間攪拌した。反応の終点はニンヒドリン反応で残存アミノ基が肉眼で観測できなくなることを確認した。この時の反応率を換算すると約82%であった。反応終了確認後、DMFで樹脂を5回洗浄した。ここに無水酢酸 (100μl) およびDMF (400μl) を加え1時間室温で攪拌した。その後DMFで十分洗浄し、得られたFK506付TOYOパ

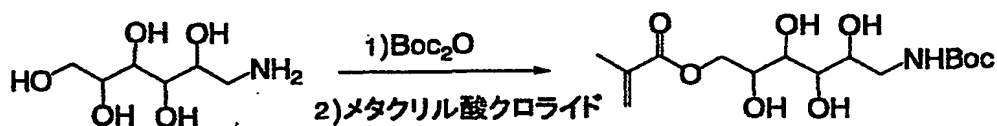
ール樹脂は後述する結合実験に用いた。TOYOパール樹脂とFK506の間に介在する基のHBA数は4、HBD数は3である（但し、FK506にあらかじめ導入された基に由来する分は数に入れない）。

製造例4：FK506付AffiGel樹脂の合成



TOYOパール樹脂の代わりにAffiGel樹脂（Bio-Rad社）を用いる以外は製造例3と同様な手法によりFK506付AffiGel樹脂を合成した。得られたFK506付AffiGel樹脂は後述する結合実験に用いた。AffiGel樹脂とFK506の間に介在する基のHBA数は3、HBD数は2である（但し、FK506にあらかじめ導入された基に由来する分は数に入れない）。

製造例5：親水性モノマーの合成：メタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステルの合成

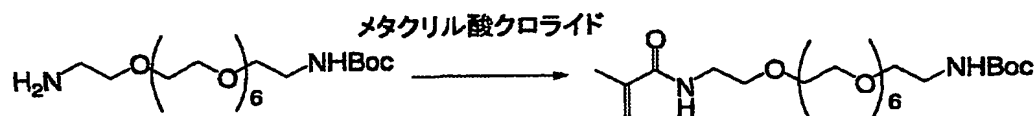


D-グルカミン（5.0g, 27.6mmol）に、水（100ml）とジオキサン（100ml）を加え、溶解させた。次いで、氷冷下ジ-tert-ブチルジカルボナート（Boc<sub>2</sub>O）（7.23ml, 33.1mmol）を加えた後、室温で終夜攪拌した。反応液を濃縮し、メタノールに溶解させ不溶物をろ過した後、ろ液を濃縮した。残渣を無水ピリジン（200ml）に溶かし、氷冷下メタクリル酸クロライド（3.74ml, 38.6mmol）を滴下した。終夜攪拌後、濃縮し、残渣に酢酸エチルを加え、得られた有機層を2N硫酸水素カリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水、次いで飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。

固形物をろ過、減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し（クロロホルム：メタノール＝１００：７で溶出）、目的とするメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル（3.32 g, 34.4%）を得た。

5  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 1.38 (9H, s), 1.98 (3H, s), 2.91–2.97 (1H, m), 3.10–3.16 (1H, m), 3.45 (1H, t), 3.57–3.61 (2H, m), 3.72–3.77 (1H, m), 4.04 (1H, dd), 4.26–4.30 (2H, m), 4.53 (1H, d), 4.73 (1H, d), 4.90 (1H, d), 5.66 (1H, t), 6.08 (1H, s), 6.52 (1H, t).

10 製造例6：ポリエチレングリコール（PEG）型親水性モノマーの合成：O-（2-メタクリロイルアミノエチル）-O-（2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル）-ヘキサエチレングリコールの合成



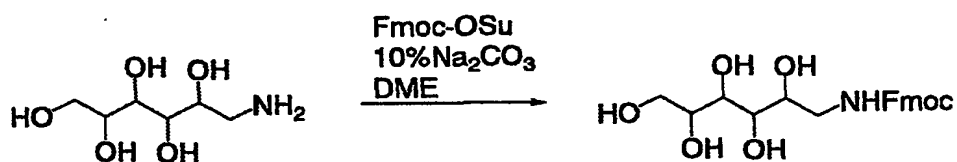
15 O-（2-アミノエチル）-O-（2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル）ヘキサエチレングリコール（100mg, 213  $\mu\text{mol}$ ）にジクロロメタン（1.0ml）とジイソプロピルアミン（55.8  $\mu\text{l}$ , 320  $\mu\text{mol}$ ）を加えた後、氷冷下メタクリル酸クロライド（31.0  $\mu\text{l}$ , 320  $\mu\text{mol}$ ）を滴下した。氷冷下2時間攪拌した後、酢酸エチルを加え得られた有機層を2N硫酸水素カリウム水溶液、次いで飽和食塩水で洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥した。固形物をろ過、減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し（酢酸エチル：アセトン＝3：1で溶出）、目的とするO-（2-メタクリロイルアミノエチル）-O-（2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル）ヘキサエチレングリコール（69.3mg, 61%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.44 (9H, s), 1.97 (3H, s), 3.31–3.33 (2H, m), 3.50–3.55 (4H, m), 3.57–3.69 (26H, m), 5.06 (1H, bs), 5.32 (1H, t), 5.71 (1H, s), 6.44 (1H, bs).

5 MS ( $m/z$ ): 537.4 ( $\text{MH}^+$ )

#### 製造例7：親水性モノマーの合成

(1) (2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル)ーカルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル メチルエステル (Fmoc-D-グルカミン) の合成

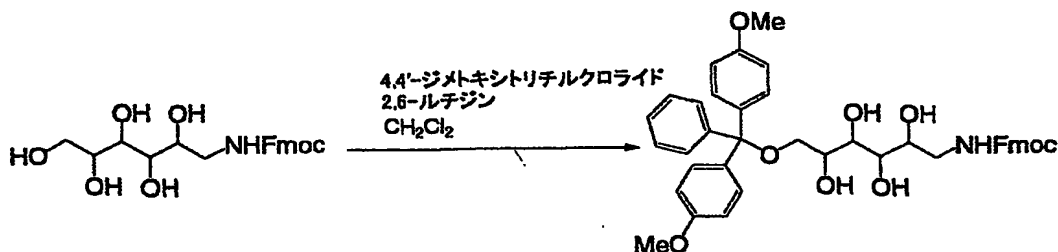


10 D-グルカミン (9.0 g, 49.7 mmol) を10%炭酸ナトリウム水溶液 200 ml と混ぜ、氷冷下攪拌した。Fmoc-OSu (16.7 g, 49.7 mmol) をDME 200 ml に溶かし、反応系中に加え、氷冷下30分間攪拌した。析出した結晶をろ取し、結晶を $\text{H}_2\text{O} \times 3$ 、メタノール $\times 3$ にて洗浄した。減圧下乾燥し、目的のFmoc体 (2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル)ーカルバミン酸9H-フルオレン-9-イル メチルエステル (20 g) を定量的に得た。

15  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 2.99–3.05 (m, 1H), 3.17–3.20 (m, 1H), 3.37–3.48 (m, 3H), 3.56–3.63 (m, 3H), 4.19–4.27 (m, 4H), 4.30–4.33 (m, 1H), 4.39–4.40 (m, 1H), 4.48–4.49 (m, 1H), 4.73 (m, 1H), 7.09–7.13 (m, 1H), 7.35 (t,  $J=7.2\text{ Hz}$ , 2H), 7.41 (t,  $J=7.2\text{ Hz}$ , 2H), 7.71 (d,  $J=7.2\text{ Hz}$ ), 7.88 (d,  $J=7.2\text{ Hz}$ , 2H).

MS ( $m/z$ ) 404 ( $\text{MH}^+$ ).

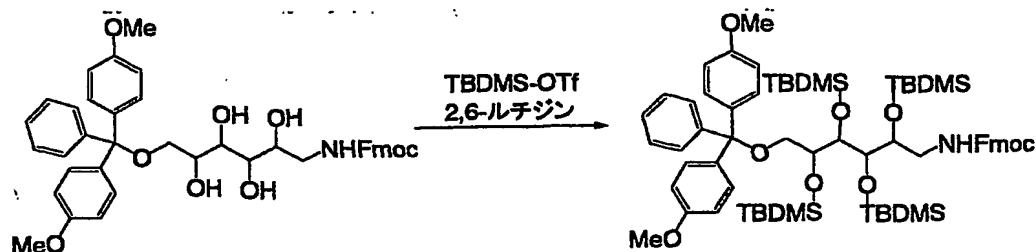
(2) {6-[ビス-(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]-2,3,4,5-テトラヒドロキシーヘキシル}-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル メチルエステルの合成



5 Fmoc-D-グルカミン (5.0 g, 12.4 mmol) をピリジン 100 ml に溶かし共沸した。この操作を 2 回行った後、乾燥ピリジン 100 ml に溶かし、窒素気流下氷冷した。4,4'-ジメトキシトリチルクロライド (5.0 g, 14.9 mmol)、DMAP (1.5 g, 12.4 mmol) を加え、氷冷下から室温にゆっくりと昇温し、室温にて 17 時間攪拌した。ピリジンを減圧留去した後、酢酸エチル 500 ml にて希釈した。水を加えた後、有機層を分離後、再び水層を酢酸エチルにて抽出した。酢酸エチル層は飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>: MeOH=10:1) にて精製し、目的の化合物 (5.06 g) を収率 57.9% にて得た。

15 <sup>1</sup>H-NMR (d-アセトン) δ: 3.23-3.38 (m, 4H), 3.67-3.95 (m, 6H), 3.77 (s, 6H), 4.05 (d, 1H), 4.18-4.24 (m, 2H), 4.31-4.33 (m, 2H), 6.51 (m, 1H), 6.86 (d, 4H), 7.17-7.42 (m, 1H), 7.51 (d, 2H), 7.70 (d, 2H), 7.86 (d, 2H).

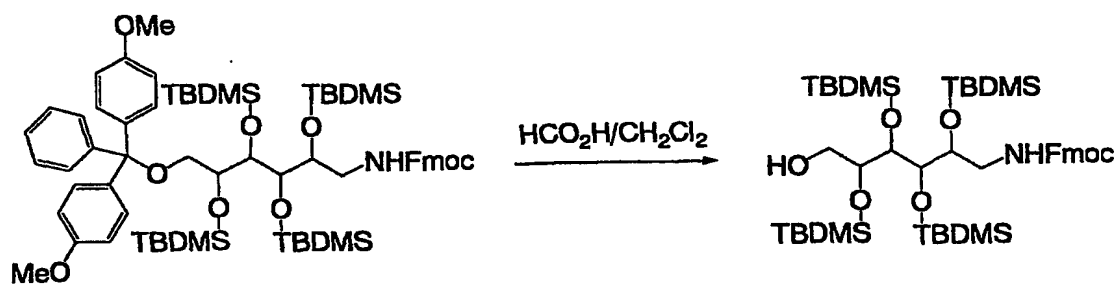
20 (3) [6-[ビス-(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]-2,3,4,5-テトラキス-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-ヘキシル]-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル メチルエステルの合成



{6-[ビス(4-メトキシフェニル)フェニルメトキシ]-2,3,4,5-テトラヒドロキシヘキシル}-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イルメチルエステル (2.46 g、3.49 mmol) を 2,6-ルチジン (15 g、140 mmol) に溶かし、氷冷下撹拌した。TBDMS-OTf (18.4 g、69.8 mmol) をゆっくりと加えた。氷冷下から室温へ戻し、一昼夜撹拌した。ジクロロメタン 200 ml、水 200 ml を加え、室温にて 2 時間撹拌した。有機層を分離後、水層をさらにジクロロメタン 200 ml にて抽出した。ジクロロメタン層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥し、減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン：酢酸エチル=5:1) にて精製し、目的の化合物 (3.5 g) を収率 86.4% にて得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -0.1-0.2 (m, 24H), 0.72 (s, 9H), 0.75 (s, 9H), 0.91-0.96 (m, 18H), 3.25 (d, 1H), 3.35-3.50 (m, 3H), 3.59 (m, 1H), 3.75 (s, 6H), 3.80 (m, 1H), 4.03-4.19 (m, 3H), 4.29-4.41 (m, 2H), 5.18 (m, 1H), 6.76 (d,  $J=8.4\text{ Hz}$ , 4H), 7.15-7.21 (m, 9H), 7.27-7.34 (m, 4H), 7.47 (t,  $J=7.2\text{ Hz}$ , 2H), 7.65 (d,  $J=7.2\text{ Hz}$ , 2H).

(4) [2,3,4,5-テトラキス(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-6-ヒドロキシヘキシル]-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イルメチルエステルの合成



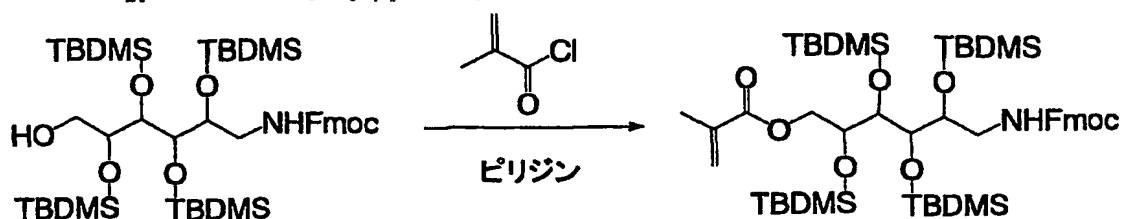
[6-〔ビス-(4-メトキシフェニル)-フェニルメトキシ〕-2,3,4,5-テトラキス-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-ヘキシル]-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル メチルエステル (1.16 g, 1 mmol) を (ギ酸 : ジクロロメタン = 1 : 10) 溶液 10 ml に溶かし、室温にて 2 時間攪拌した。飽和重曹水に反応液を注ぎ込み、ジクロロメタン 100 ml にて抽出した。ジクロロメタン層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : 酢酸エチル = 10 : 1 ~ 5 : 1) にて精製し、目的のアルコール体 (600 mg) を収率 69.8% にて得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : -0.50-0.10 (m, 24H), 0.77-0.87 (m, 36H), 2.10 (m, 1H), 3.29-3.36 (m, 1H), 3.43-3.56 (m, 2H), 3.57-3.61 (m, 1H), 3.65-3.71 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 4.03 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.27-4.32 (m, 2H), 4.90 (m, 1H), 7.17-7.21 (m, 2H), 7.29 (t,  $J=7.6\text{ Hz}$ , 2H), 7.49 (t,  $J=7.6\text{ Hz}$ , 2H), 7.66 (d,  $J=7.6\text{ Hz}$ , 2H).

MS ( $m/z$ ) 860 ( $\text{MH}^+$ ).

(5) 2-メチル-アクリル酸 2,3,4,5-テトラキス-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-6-(9H-フルオレン-9-イル メトキシカルボニルアミノ)-ヘキシル エステルの合成





[2, 3, 4, 5-テトラキスー (tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ) - 6-ヒドロキシヘキシル] - カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル メチルエステル (460mg, 0.54mmol) に、ジクロロメタン (10ml) を加え、窒素気流下、5℃にて攪拌した。次いで、メタクリル酸クロライド (560mg, 5.4mmol) を滴下した。氷冷下30分攪拌した後、室温にて30分間攪拌した。反応系中に水を加え、酢酸エチルにて2回抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物をろ過、減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、目的とする2-メチルー

5

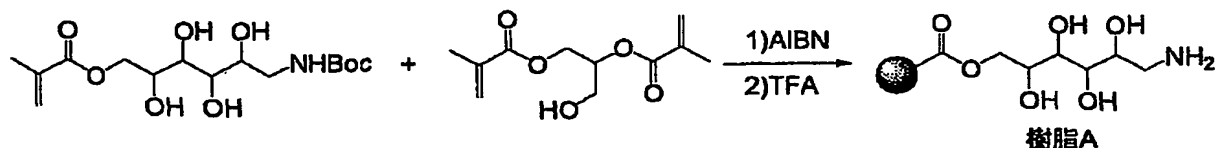
10

アクリル酸 2, 3, 4, 5-テトラキスー (tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ) - 6- (9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ) - ヘキシル エステル (200mg, 39%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (d-アセトン)  $\delta$  : 0.0-0.10 (24H, m), 0.91 (36H, m), 1.95 (3H, s), 3.45 (1H, m), 3.55 (1H, m), 3.60 (1H, m), 3.90-4.95 (7H, m), 5.00 (1H, m), 5.55 (1H, m), 6.10 (1H, s), 7.29 (2H, m), 7.39 (2H, t), 7.58 (2H, t), 7.75 (2H, d).

15

#### 製造例8 : 樹脂Aの合成



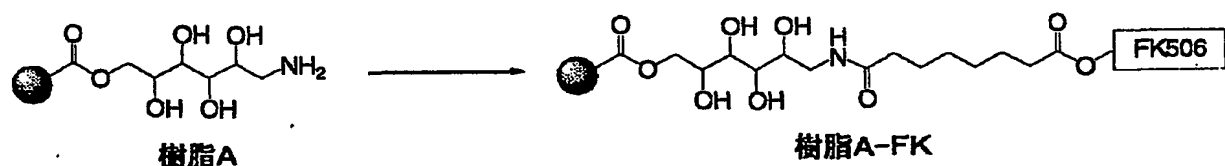
製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-

20

2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (300 mg, 859  $\mu\text{mol}$ ) に、1, 4-ジオキサン (750  $\mu\text{l}$ )、グリセロール ジメタクリレート (3.50  $\mu\text{l}$ , 17  $\mu\text{mol}$ ; 架橋剤濃度約 2.0%) およびアゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 1.65 mg) を加え、窒素気流下 100°C で 2 時間反応させた。

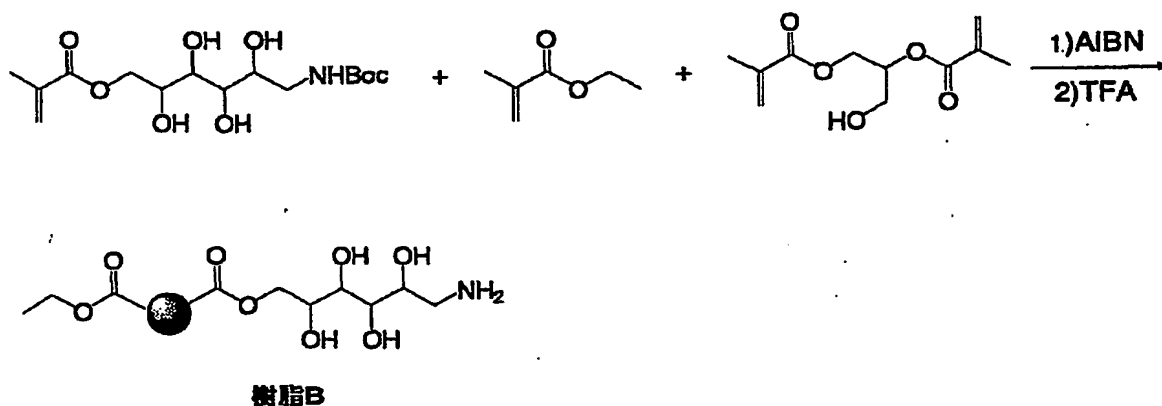
- 5 得られた不溶物をジメチルホルムアミド (DMF)、メタノール、ジエチルエーテルで十分に洗浄した後、減圧下乾燥させた。得られた樹脂 257 mg (84.6%) のうち、200 mg にトリフルオロ酢酸: ジクロロメタン: 1, 4-ジオキサン = 2: 1: 1 混合溶液 40 ml を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、樹脂を 1, 4-ジオキサン、メタノール、ジエチルエーテル、DMF で十分洗浄した後、
- 10 5% ジイソプロピルエチルアミン/N-メチル-2-ピロリドン (NMP) 溶液中、室温で終夜攪拌した。次いで、NMP、メタノール、ジエチルエーテル、DMF、メタノールで十分に洗浄した後、減圧下乾燥し、目的とする樹脂 A (141 mg) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約 4.9  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  のアミノ基が存在することを確認した。

15 製造例 9: FK506 付樹脂 A: 樹脂 A-FK の合成



- 製造例 8 で調製した樹脂 A (20.0 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は 98  $\mu\text{mol}$ )、17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシーヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ [22.3.1.0<sup>4,9</sup>] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (9.4 mg, 9.8  $\mu\text{mol}$ )、EDC/HCl (4.5 mg, 23  $\mu\text{mol}$ )、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt; 3.2 mg, 24  $\mu\text{mol}$ ) およ
- 20

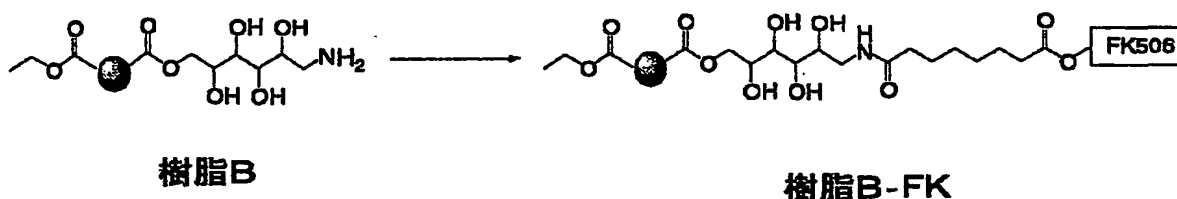
びN-メチル-2-ピロリドン (NMP ; 0.5 ml) の混合物を室温で終夜撹拌  
 した。反応の終点はHPLCにて17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-  
 {2-[4-(7-カルボキシ-ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロ  
 ヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21,  
 5 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザートリシクロ[22.3.  
 1.0<sup>4,9</sup>]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンがほぼ消失  
 することで確認した。この時の反応率を換算すると約9%であった。反応終了確認  
 後、DMF、メタノール、ジエチルエーテル、DMF:H<sub>2</sub>O=1:1で樹脂を十分  
 洗浄した。ここに無水酢酸:DMF=1:9 (1.5 ml) を加え1時間室温で撹  
 10 拌した。メタノールで洗浄後、ニンヒドリン反応による反応確認を行い、残存アミ  
 ノ基が肉眼で観測できなくなるまで無水酢酸:DMF=1:9混合溶液による反応  
 を繰り返した。反応終了確認後、DMF、メタノール、ジエチルエーテルで十分洗  
 浄後、得られたFK506付樹脂A (樹脂A-FK) は後述する結合実験に用いた。  
 製造例10: メタクリル酸エチルとの共重合による樹脂Bの合成



製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-  
 2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (30 mg, 86 μmol)  
 に、1, 4-ジオキササン (750 μl)、メタクリル酸エチル (96.2 μl, 77  
 3 μmol)、グリセロール ジメタクリレート (20.6 μl, 86 μmol; 架  
 20 橋剤濃度約10.0%) およびアゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 1.4 mg)

を加え、窒素気流下  $100^{\circ}\text{C}$  で 24 時間反応させた。得られた不溶物をジメチルホルムアミド (DMF)、メタノール、ジエチルエーテルで十分に洗浄した後、減圧下乾燥させた。得られた樹脂  $101\text{mg}$  (72%) にトリフルオロ酢酸 : ジクロロメタン = 1 : 1 混合溶液  $8\text{ml}$  を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、樹脂を DMF で十分に洗浄した後、5% ジイソプロピルエチルアミン / DMF 溶液中、室温で終夜攪拌した。次いで、DMF、ジエチルエーテルで十分に洗浄した後、減圧下乾燥し、目的とする共重合体 ( $85\text{mg}$ ) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約  $0.63\mu\text{mol}/\text{mg}$  のアミノ基が存在することを確認した。

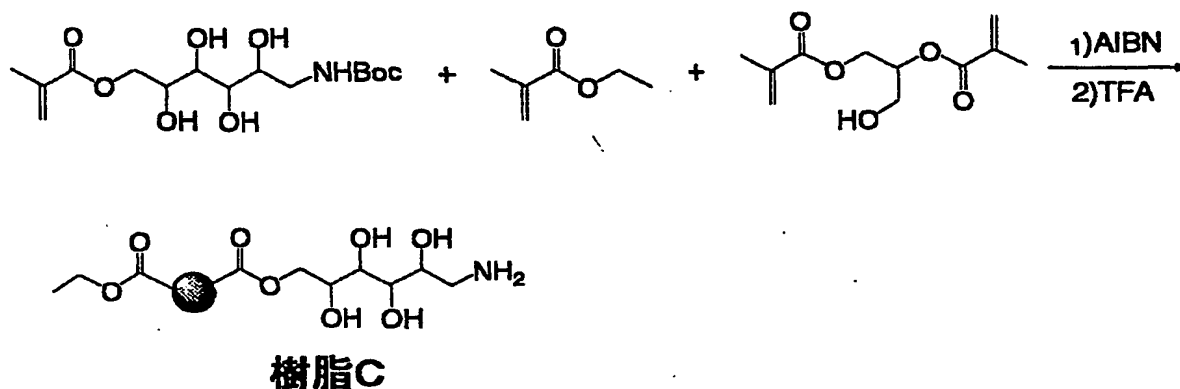
製造例 11 : FK506 付樹脂 B : 樹脂 B-FK の合成



製造例 10 で調製した樹脂 B ( $16\text{mg}$ 、遊離アミノ基 (available amino group) は  $10\mu\text{mol}$ )、17-アシル-1,14-ジヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシーヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23,25-ジメトキシ-13,19,21,27-テトラメチル-11,28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[2.3.1.0<sup>4,9</sup>]オクタコス-18-エン-2,3,10,16-テトラオン ( $38.4\text{mg}$ ,  $0.04\text{mmol}$ )、EDC/HCl ( $9.2\text{mg}$ ,  $0.048\text{mmol}$ )、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt;  $6.5\text{mg}$ ,  $0.048\text{mmol}$ ) およびジメチルホルムアミド (DMF;  $0.5\text{ml}$ ) の混合物を室温で終夜攪拌した。反応の終点はニンヒドリン反応で残存アミノ基が肉眼で観測できなくなることで確認した。この時の反応率を換算すると 100% であった。反応終了確認後、DMF、メタノール、ジエチルエーテルで樹脂を十分に洗浄した。ここに無水酢酸 : メタノール : N-メチル-2-ピロリドン (NMP) = 1 : 1 : 8 混合溶液 (1.

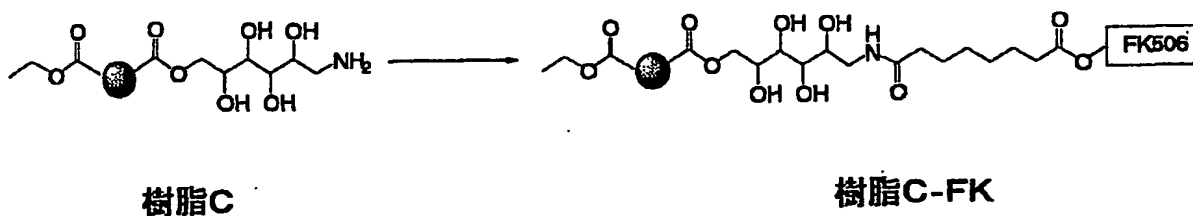
0 ml) を加え 1 時間室温で攪拌した。その後 DMF、メタノール、ジエチルエーテルで十分洗浄し、FK 506 付樹脂 B (樹脂 B-FK) を得た。

製造例 12 : メタクリル酸エチルとの共重合による樹脂 C の合成



- 5 製造例 8 と同様にして、製造例 5 で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (90 mg, 258  $\mu$ mol)、メタクリル酸エチル (289  $\mu$ l, 2.32 mmol)、グリセロール ジメタクリレート (10.5  $\mu$ l, 43.8  $\mu$ mol ; 架橋剤濃度約 1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN : 4.2 mg) および 1, 4-ジオキサン (750  $\mu$ l) を用いて、樹脂 C (141 mg) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約 1.5  $\mu$ mol/mg のアミノ基が存在することを確認した。
- 10

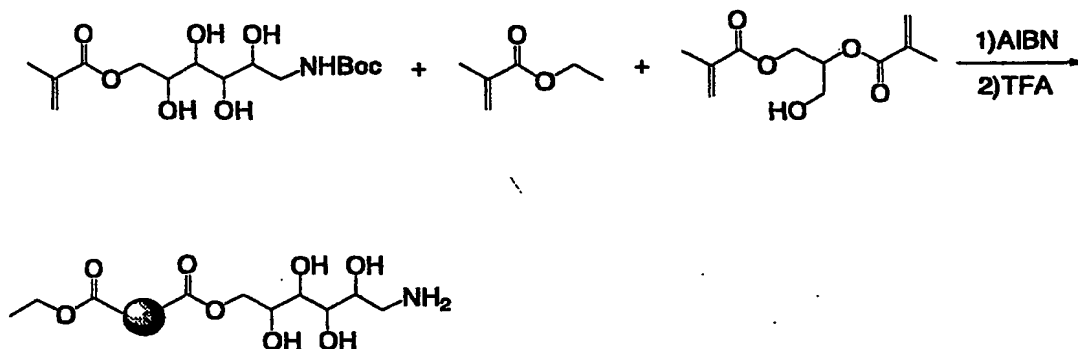
製造例 13 : FK 506 付樹脂 C : 樹脂 C-FK の合成



- 15 製造例 12 で調製した樹脂 C (6.7 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は 10  $\mu$ mol) より、製造例 11 と同様にして FK 5

06付樹脂C--(樹脂C-FK)を得た。

製造例14：メタクリル酸エチルとの共重合による樹脂Dの合成

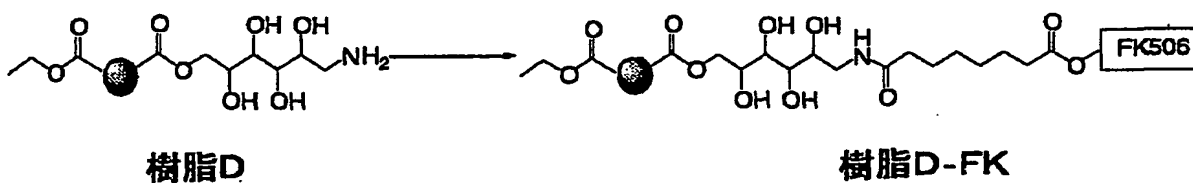


樹脂D

5 製造例8と同様にして、製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2,3,4,5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (150mg, 429  $\mu\text{mol}$ )、メタクリル酸エチル (441  $\mu\text{l}$ , 3.86mmol)、グリセロール ジメタクリレート (17.5  $\mu\text{l}$ , 73.0  $\mu\text{mol}$ ; 架橋剤濃度約1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 7.1mg) および1,4-ジオキサン (750  $\mu\text{l}$ ) を用いて、樹脂D (117mg) を得た。なお、ニン

10 ヒドリン反応により樹脂中に約1.3  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  のアミノ基が存在することを確認した。

製造例15：FK506付樹脂D：樹脂D-FKの合成



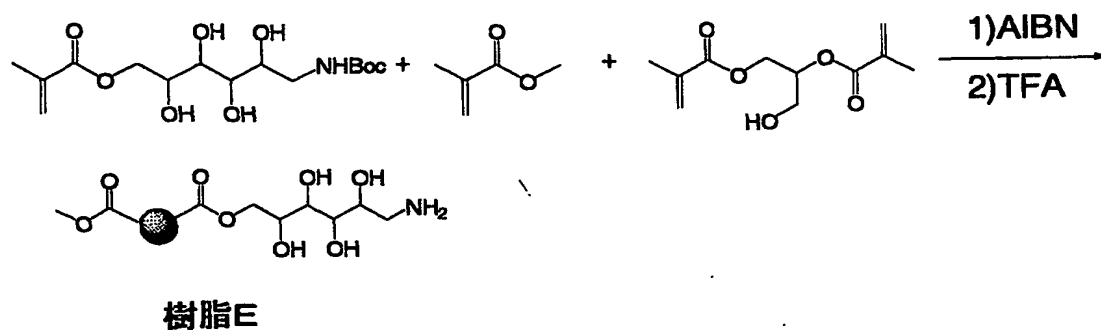
樹脂D

樹脂D-FK

15 製造例14で調製した樹脂D (7.7mg、遊離アミノ基 (available amino group) は10  $\mu\text{mol}$ ) より、製造例11と同様にしてFK5

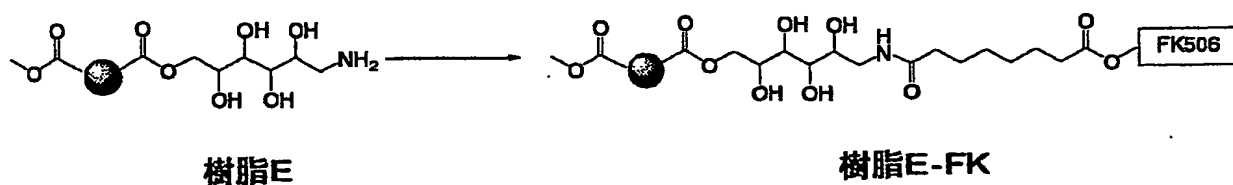
0.6付樹脂D<sup>+</sup> (樹脂D-FK) を得た。

製造例16：メタクリル酸メチルとの共重合による樹脂Eの合成



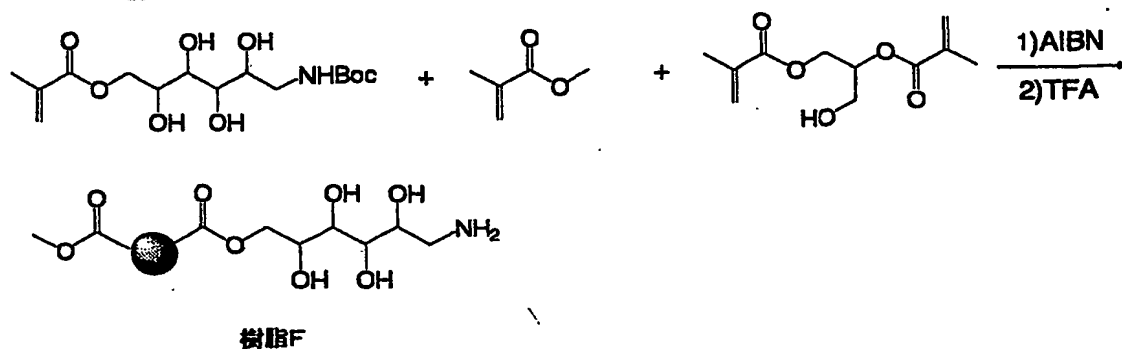
5 製造例8と同様にして、製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2,3,4,5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (30mg, 85.9  $\mu\text{mol}$ )、メタクリル酸メチル (82.7  $\mu\text{l}$ , 773  $\mu\text{mol}$ )、グリセロール ジメタクリレート (20.6  $\mu\text{l}$ , 85.9  $\mu\text{mol}$ ; 架橋剤濃度約10%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 1.4mg) および1,4-ジオキサン (750  $\mu\text{l}$ ) を用いて、樹脂E (59mg) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約0.89  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  のアミノ基が存在することを確認した。

製造例17：FK506付樹脂E：樹脂E-FKの合成



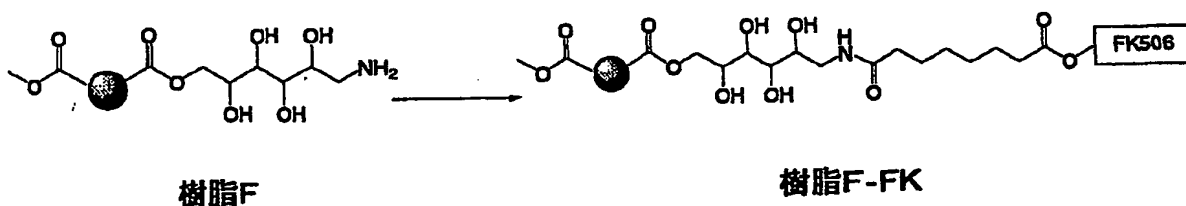
15 製造例16で調製した樹脂E (11mg、遊離アミノ基 (available amino group) は10  $\mu\text{mol}$ ) より、製造例11と同様にしてFK506付樹脂E (樹脂E-FK) を得た。

製造例18：メタクリル酸メチルとの共重合による樹脂Fの合成



製造例 8 と同様にして、製造例 5 で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (90 mg, 258  $\mu\text{mol}$ )、メタクリル酸メチル (248  $\mu\text{l}$ , 2.32 mmol)、グリセロール ジメタクリレート (10.5  $\mu\text{l}$ , 43.8  $\mu\text{mol}$ ; 架橋剤濃度約 1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 4.2 mg) および 1, 4-ジオキサン (750  $\mu\text{l}$ ) を用いて、樹脂 F (171 mg) を得た。なお、ニヒドリン反応により樹脂中に約 0.84  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  のアミノ基が存在することを確認した。

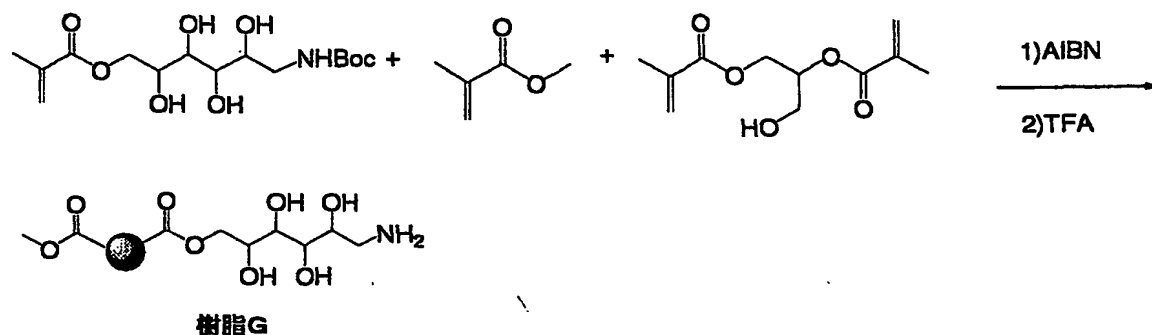
10 製造例 19 : FK506 付樹脂 F : 樹脂 F-FK の合成



製造例18で調製した樹脂F(12mg、遊離アミノ基(available amino group)は10 $\mu$ mol)より、製造例11と同様にしてFK506付樹脂F(樹脂F-FK)を得た。

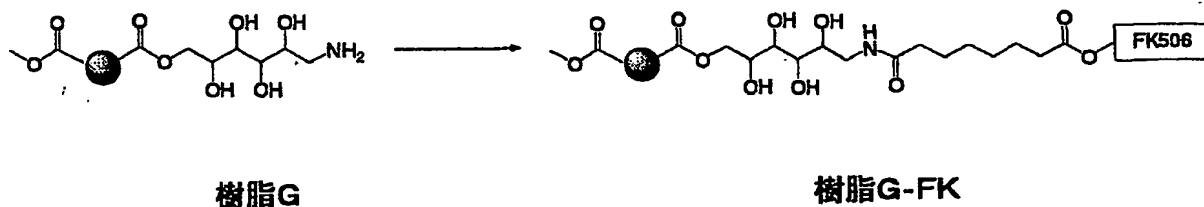
15 製造例 20：メタクリル酸メチルとの共重合による樹脂 G の合成





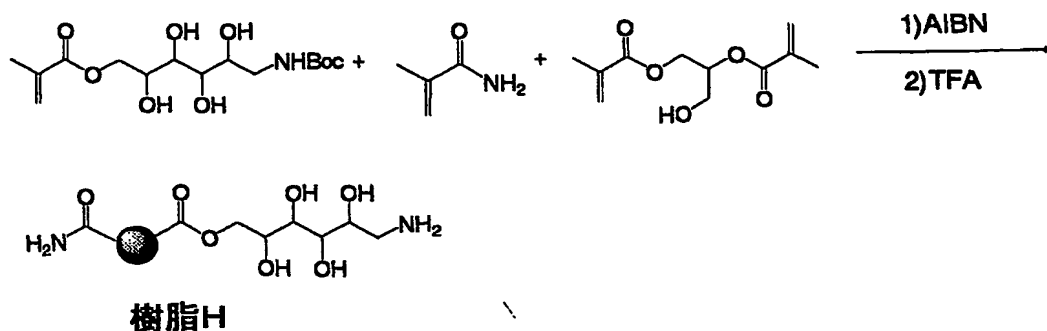
製造例 8 と同様にして、製造例 5 で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (150 mg, 429  $\mu$ mol)、メタクリル酸メチル (413  $\mu$ l, 3.86 mmol)、グリセロール ジメタクリレート (17.5  $\mu$ l, 73.0  $\mu$ mol; 架橋剤濃度約 1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 7.1 mg) および 1, 4-ジオキサン (750  $\mu$ l) を用いて、樹脂 G (243 mg) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約 1.5  $\mu$ mol/mg のアミノ基が存在することを確認した。

10 製造例 21 : FK506 付樹脂 G : 樹脂 G-FK の合成



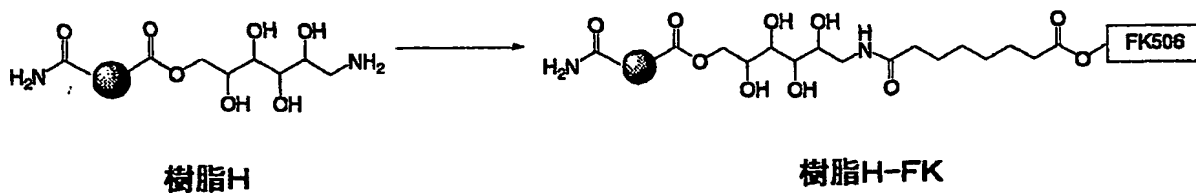
製造例20で調製した樹脂G(6.5mg、遊離アミノ基(available amino group)は10 $\mu$ mol)より、製造例11と同様にしてFK506付樹脂G(樹脂G-FK)を得た。

15 製造例 22：メタクリルアミドとの共重合による樹脂 H の合成



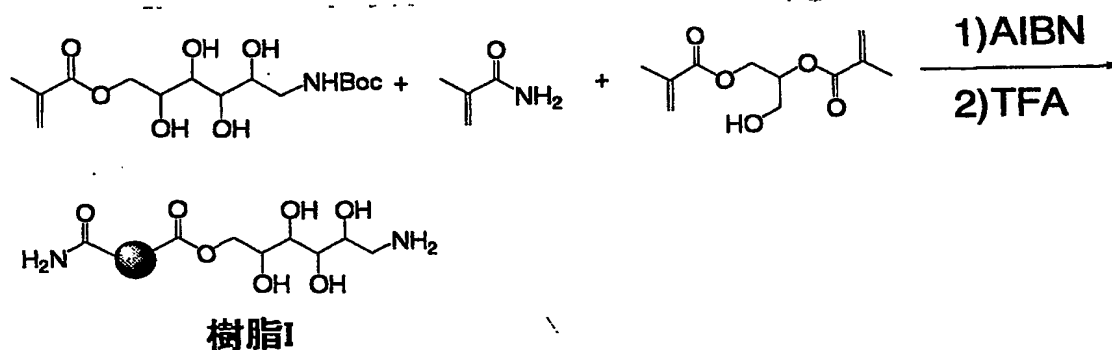
製造例 8 と同様にして、製造例 5 で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (30 mg, 85.9  $\mu\text{mol}$ )、メタクリルアミド (65.8 mg, 773  $\mu\text{mol}$ )、グリセロール ジメタクリレート (20.6  $\mu\text{l}$ , 85.9  $\mu\text{mol}$ ; 架橋剤濃度約 10.0%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 1.4 mg) および 1, 4-ジオキサン (750  $\mu\text{l}$ ) を用いて、樹脂 H (9.7 mg) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約 0.72  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  のアミノ基が存在することを確認した。

#### 10 製造例 23: FK506 付樹脂 H: 樹脂 H-FK の合成



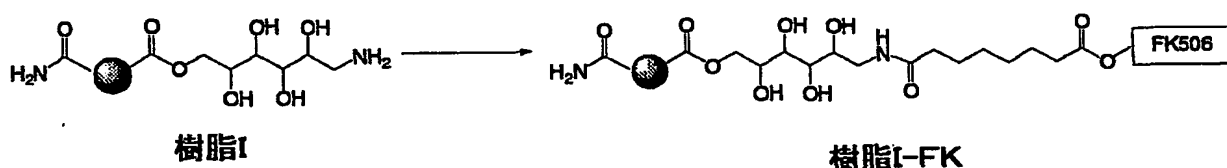
製造例 22 で調製した樹脂 H (4.2 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は 3.0  $\mu\text{mol}$ ) より製造例 11 に述べた方法に準じ、目的とする FK506 付樹脂 H (樹脂 H-FK) を得た。

#### 15 製造例 24: メタクリルアミドとの共重合による樹脂 I の合成



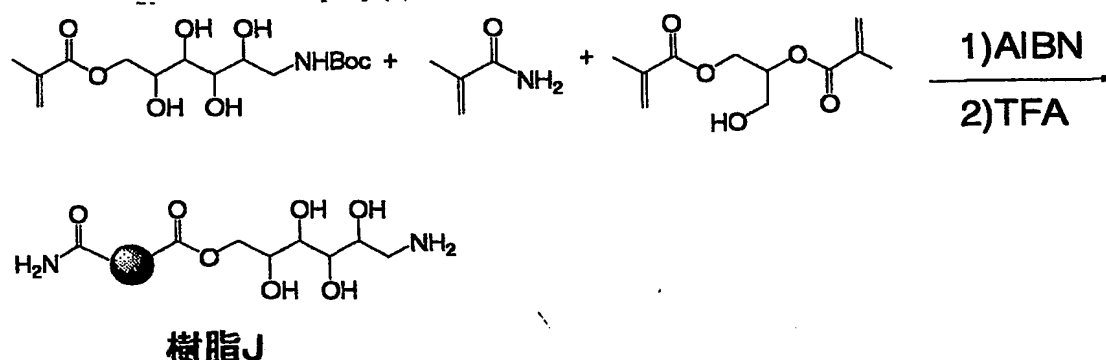
製造例 8 と同様にして、製造例 5 で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (90 mg, 258  $\mu\text{mol}$ )、メタクリルアミド (197 mg, 2.32 mmol)、グリセロール ジメタクリレート (10.5  $\mu\text{l}$ , 43.8  $\mu\text{mol}$ ; 架橋剤濃度約 1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 4.2 mg) および 1, 4-ジオキサン (750  $\mu\text{l}$ ) を用いて、樹脂 I (99 mg) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約 0.79  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  のアミノ基が存在することを確認した。

#### 10 製造例 25 : FK506 付樹脂 I : 樹脂 I-FK の合成



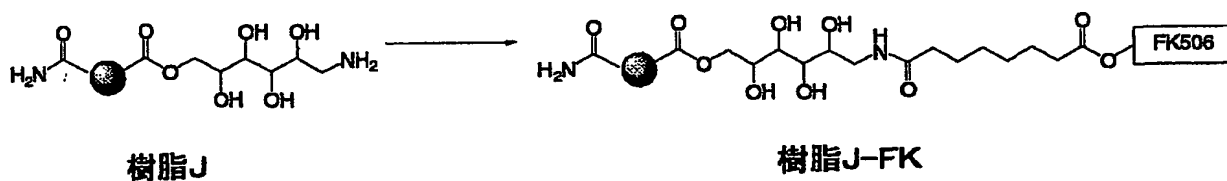
製造例 24 で調製した樹脂 I (13 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は 10  $\mu\text{mol}$ ) より製造例 11 に述べた方法に準じ、目的とする FK506 付樹脂 I (樹脂 I-FK) を得た。

#### 15 製造例 26 : メタクリルアミドとの共重合による樹脂 J の合成



製造例8と同様にして、製造例5で調製したメタクリル酸 6-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (150mg, 429  $\mu\text{mol}$ )、メタクリルアミド (329mg, 3.86mmol)、グリセロール ジメタクリレート (17.5  $\mu\text{l}$ , 73.0  $\mu\text{mol}$ ; 架橋剤濃度約1.7%)、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 7.1mg) および1, 4-ジオキサン (750  $\mu\text{l}$ ) を用いて、樹脂J (62mg) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約1.2  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  のアミノ基が存在することを確認した。

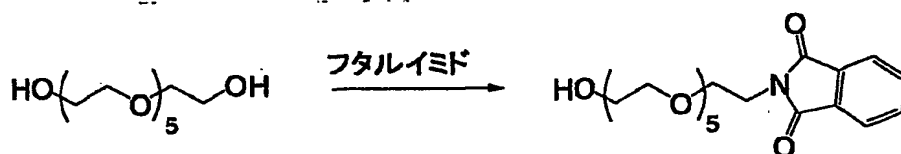
#### 10 製造例27: FK506付樹脂J: 樹脂J-FKの合成



製造例26で調製した樹脂J (8.3mg、遊離アミノ基 (available amino group) は10  $\mu\text{mol}$ ) より製造例11に述べた方法に準じ、目的とするFK506付樹脂J (樹脂J-FK) を得た。

#### 15 製造例28: PEG型親水性モノマーの合成

(1) O-(2-フタルイミドエチル) ペンタエチレングリコールの合成

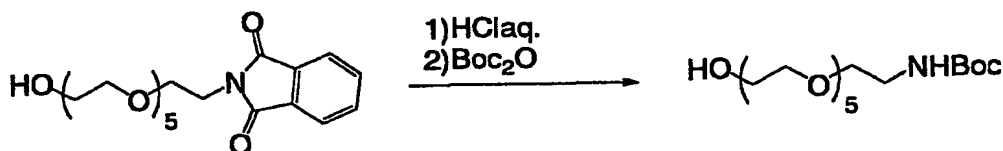


フタルイミド (31.3 g, 213 mmol) にテトラヒドロフラン (600 ml)、ヘキサエチレングリコール (50 g, 177 mmol) 及びトリフェニルホスフィン (55.7 g, 213 mmol) を加えた。氷冷下、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート (40% トルエン溶液, 98.5 ml, 195 mmol) を滴下した後、室温で終夜攪拌した。反応液を濃縮し、残渣に酢酸エチルを加え不溶物をろ過した。ろ液に飽和食塩水を加え、二層分離後、水層を酢酸エチルで抽出し、有機層をまとめた。得られた有機層は無水硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物をろ過、減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し (酢酸エチル: アセトン = 4:1 で溶出)、目的とする O-(2-フタルイミドエチル) ペンタエチレングリコール (32.7 g, 45%) を得た。

$$^1\text{H-NMR (CDCl}_3\text{)} \delta : 3.58-3.69 (18\text{H, m}), 3.71-3.75 (4\text{H, m}), 3.90 (2\text{H, t}), 7.71 (2\text{H, dd}), 7.85 (2\text{H, dd}).$$

MS (m/z) : 412. 2 (MH<sup>+</sup>)

(2) O-(2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル) ペンタエチレング  
リコールの合成



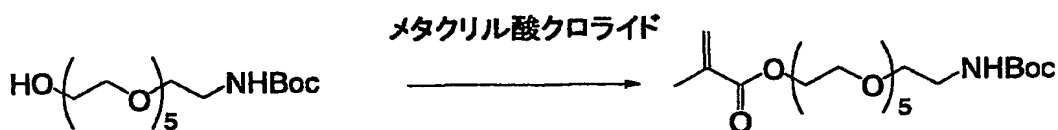
上記(1)で調製したO-(2-フタルイミドエチル)ペンタエチレングリコール(8.13g, 19.8mmol)に8N塩酸水(25ml)を加え、5時間加熱還流させた。放冷後、不溶物をろ過し、得られた水溶液をクロロホルム及び酢酸

エチルで洗浄した。得られた水層にジオキサン (80 ml) を加えた後、水酸化ナトリウム水溶液で pH 9~10 に調整しながら、ジ-tert-ブチルジカルボナート (5.19 g, 23.8 mmol) を加えた。室温で1時間攪拌した後、反応液を減圧濃縮しジオキサンを留去した。残った水溶液は酢酸エチルで抽出し、得られた有機層をまとめ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。固形物をろ過、減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し (酢酸エチル:アセトン=1:0~1:1で溶出)、目的とするO-(2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル)ペンタエチレングリコール (4.66 g, 62%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.44 (9H, s), 3.32 (2H, t), 3.54 (2H, t), 3.60-3.69 (18H, m), 3.73 (2H, t), 5.22 (1H, bs).

MS ( $m/z$ ): 382.2 ( $\text{MH}^+$ )

(3) O-(2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル)-O-(2-メタクリロイルオキシエチル)テトラエチレングリコールの合成



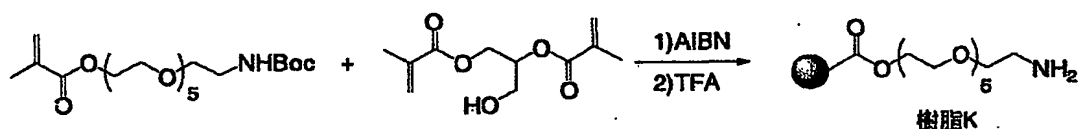
上記(2)で調製したO-(2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル)ペンタエチレングリコール (4.66 g, 12.2 mmol) にジエチルエーテル (150 ml) を加えた。次いで、ピリジン (3.7 ml) 及びメタクリル酸クロライド (2.37 ml, 24.5 mmol) を加え、約1日攪拌した。ハイドロキノ (0.8 g) と酢酸エチルを加えた後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、2Nクエン酸水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。固形物をろ過、減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し (酢酸エチルで溶出)、目的とするO-(2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル)-O-(2-メタクリロイルオキシエチル)テトラエチレングリコール (4.

46 g, 81%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.44 (9H, s), 1.95 (1H, t), 3.30 (2H, t), 3.54 (2H, t), 3.60–3.68 (16H, m), 3.75 (2H, t), 4.30 (2H, t), 5.06 (1H, bs), 5.57 (1H, t), 6.13 (1H, bs).

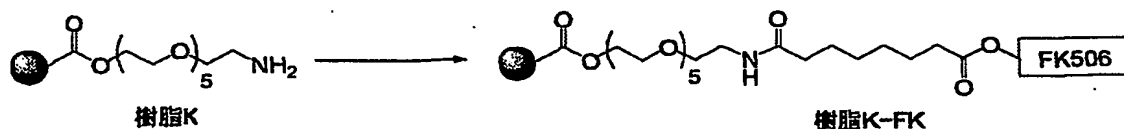
MS ( $m/z$ ): 467.3 ( $\text{MNa}^+$ )

製造例 29: 樹脂 K の合成



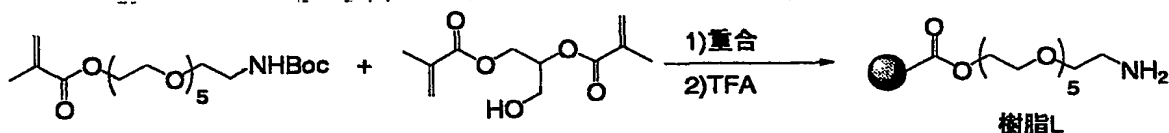
製造例 28 で調製した O-(2-tert-butoxycarbonylaminoethyl)-O-(2-methacryloyloxyethyl) テトラエチレングリコール (212 mg, 0.484 mmol)、1,4-ジオキサン (424  $\mu\text{l}$ )、グリセロール ジメタクリレート (11.6  $\mu\text{l}$ , 0.048 mmol; 架橋剤濃度 10%) および アゾビスイソブチロニトリル (AIBN: 0.8 mg) より、製造例 8 と同様にし、目的とする樹脂 K (122 mg) を得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約 3.8  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  のアミノ基が存在することを確認した。

製造例 30: FK506 付樹脂 K: 樹脂 K-FK の合成 (溶液重合)



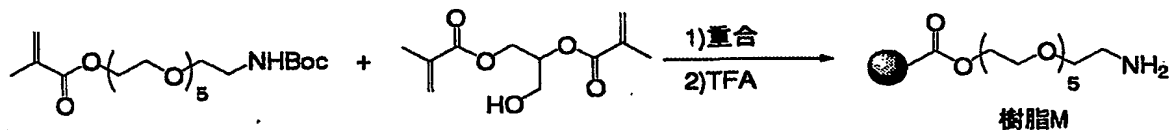
製造例 29 で調製した樹脂 K (2.6 mg、遊離アミノ基 (available amino group) は 3.8  $\mu\text{mol}$ ) より製造例 11 に述べた方法に準じ、目的とする FK506 付樹脂 K (樹脂 K-FK) を得た。

製造例 31: 樹脂 L の合成 (乳化重合)



製造例 28 で調製した O- (2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル) -O- (2-メタクリロイルオキシエチル) テトラエチレングリコール (188 mg, 0.418 mmol) の酢酸ブチル溶液 (98 mg) に、グリセロール ジメタクリレート (2.01  $\mu$ l, 0.008 mmol ; 架橋剤濃度約 1.9%)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (54 mg) -過硫酸アンモニウム (1 mg) 水溶液 (5.4 ml) を加えた後、良く攪拌し乳化状態とした。70℃で終夜攪拌後、水、DMF、ジオキサンでよく洗浄した。次いで、トリフルオロ酢酸 : 1, 4-ジオキサン = 2 : 1 混合溶液 40 ml を加え、室温で終夜攪拌した。反応終了後、樹脂を 1, 4-ジオキサン、DMF で十分洗浄し、さらに炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、水、DMF で十分に洗浄した後、樹脂 L を得た。

製造例 32 : 樹脂 M の合成 (懸濁重合)

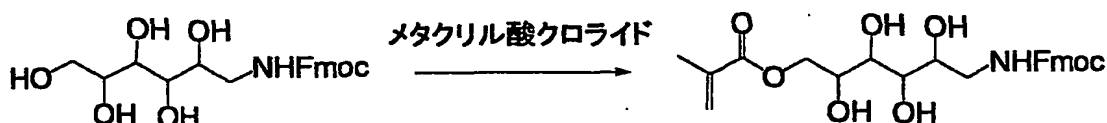


製造例 28 で調製した O- (2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル) -O- (2-メタクリロイルオキシエチル) テトラエチレングリコール (188 mg, 0.418 mmol) の酢酸ブチル溶液 (98 mg) に、グリセロール ジメタクリレート (2.01  $\mu$ l, 0.008 mmol ; 架橋剤濃度約 1.9%)、ポリビニルアルコール [1000、完全けん化型] 水溶液 (51 mg / 2.6 ml) 及び炭酸カルシウム (14 mg) を加えた。激しく攪拌しながら、70℃で 1.5 時間、さらに 80℃で 1.5 時間反応させた。次いで、水、DMF、ジオキサンでよく洗浄した後、トリフルオロ酢酸 : ジクロロメタン : 1, 4-ジオキサン = 2 : 1 :



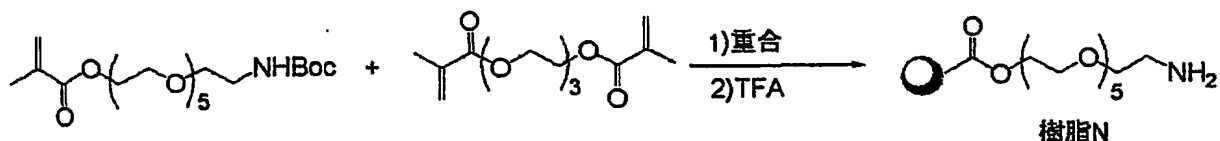
1 混合溶液 40 ml を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、樹脂を 1, 4-ジオキサン、DMF で十分洗浄した後、5% ジイソプロピルエチルアミン / DMF 溶液中、室温で終夜攪拌した。次いで、DMF、メタノールで十分に洗浄した後、樹脂 M を得た。

- 5 製造例 33 : 親水性モノマーの合成 : メタクリル酸 6-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステルの合成



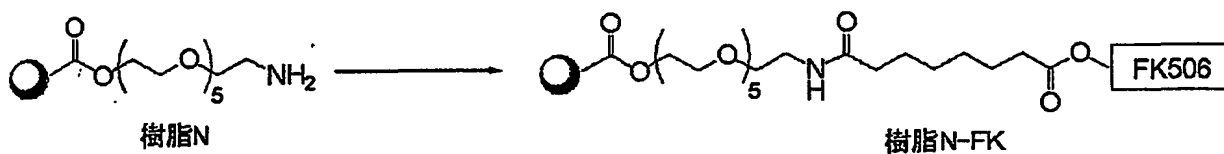
- 10 製造例 7 で調製した Fmoc-D-グルカミン (10 g, 24.9 mmol) に 無水ピリジン (300 ml) を加え、氷冷下メタクリル酸クロライド (3.8 ml, 40.0 mmol) を滴下した後、室温で終夜攪拌した。氷冷下、メタノール (100 ml) を加えた後、濃縮した。残渣を酢酸エチルに溶かし、飽和食塩水で洗浄した後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させた。固形物をろ過、減圧濃縮した後、  
15 得られた残渣をシリカゲルカラムで精製後 (クロロホルム : メタノール = 10 : 1 で溶出)、メタノール-ジエチルエーテルより結晶化を行い、目的とするメタクリル酸 6-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2, 3, 4, 5-テトラヒドロキシヘキシル エステル (2.29 g, 22.1%) を得た。  
 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1.95 (3H, s), 3.16 (1H, bs), 3.35-3.40 (3H, m), 3.68-3.72 (3H, m), 3.82 (1H, bs), 3.88 (1H, m), 3.97 (1H, m), 4.17 (1H, t), 4.40 (2H, m), 5.37 (1H, bs), 5.61 (1H, s), 6.16 (1H, s), 7.30 (2H, t), 7.39 (2H, t), 7.56 (2H, d), 7.75 (2H, d).  
20 MS ( $m/z$ ) : 472.2 ( $\text{MH}^+$ )

## 製造例 34 : 樹脂Nの合成 (乳化重合)



製造例 28 で調製した O- (2-tert-ブトキシカルボニルアミノエチル) -O- (2-メタクリロイルオキシエチル) テトラエチレングリコール (193 mg, 0.429 mmol) に酢酸ブチル (166  $\mu$ l)、トリエチレングリコール ジメタクリレート (49.2  $\mu$ l, 0.184 mmol; 架橋剤濃度約 43%)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート水溶液 (79 mg / 79 ml) を加えた後、良く攪拌し乳化状態とした。過硫酸アンモニウム (0.7 mg) を加え 70°C で終夜攪拌後、水、DMF、ジオキサンでよく洗浄した。次いで、トリフルオロ酢酸 : 1, 4-ジオキサン : ジクロロメタン : 水 = 50 : 35 : 10 : 5 混合溶液 14 ml を加え、室温で終夜攪拌した。反応終了後、樹脂を 1, 4-ジオキサン、DMF で十分洗浄し、さらに炭酸水素ナトリウム水溶液-DMF 混合液で洗浄した後、水-DMF 混合液、DMF で十分に洗浄し樹脂Nを得た。なお、ニンヒドリン反応により樹脂中に約 0.350 mmol / ml のアミノ基が存在することを確認した。

## 製造例 35 : FK506 付樹脂N : 樹脂N-FK の合成



製造例 34 で調製した樹脂N (遊離アミノ基 : 50  $\mu$ mol 相当懸濁液) より製造例 9 (樹脂A-FK) に述べた方法に準じ、目的とする FK506 付樹脂N (樹脂N-FK) を得た。

## 実験例 1 : 結合実験

## (1) lysate の調製

ラットの脳 (2.2 g) を混合液 A (0.25 M シュクロース, 25 mM Tris バッファー (pH 7.4), 22 ml) に混ぜ、ホモジネートを作成後、900

0 rpmで10分間遠心分離した。遠心分離上清を取り、50000 rpmでさらに15分間遠心分離した。こうして得られた上清をlysateとして使用した。なお、実験はすべて4℃あるいは氷上で行った。

## (2) 結合実験

- 5 上記したFK506を結合した各種アフィニティー樹脂を用いて以下の手順でlysateとの結合実験を行った。なお、lysateは混合液Aで1/2に希釈して使用した。FK506付TOYOパール樹脂、FK506付AffiGel樹脂はそれぞれ10  $\mu$ l、樹脂A-FKは0.1  $\mu$ mol相当分、並びに樹脂B-FK～樹脂J-FKは1.0  $\mu$ mol相当分を使用した。また、樹脂N-FKは1.0  $\mu$ mol相当分を使用した。

FK506結合アフィニティー樹脂とlysate (1ml) を4℃で終夜、静かに振とうした。その後、上清を除き、残ったFK506結合アフィニティー樹脂を混合液Aで4回十分に洗浄してFK506結合アフィニティー樹脂表面を十分に洗浄した。

- 15 こうして得られたFK506結合アフィニティー樹脂に20  $\mu$ lのSDS用loading buffer (nakalai cat. NO=30566-22、電気泳動用sample buffer solution with 2-ME (2-mercaptoethanol) (2x) for SDS PAGE) を加え、25℃で10分間加熱した。こうして得られたサンプル液を市販のSDSゲル (BioRad readyGel J, 15%SDS, cat. NO=161-J341) で分離し、そのSDSゲルを解析した。解析にはSCANNER JX330 (SHARP) およびImageMaster version 2.01 (Pharmacia Biotech) を用い、比較例である製造例3のFK506付TOYOパール樹脂に結合 (吸着) した分子の内、FKBP12 (バンド4) を含む代表的な4種類のバンド (バンド1～バンド4) を選択し、そのピークの量を各製造例および比較例の樹脂について測定し、バンド4での値を基準値 (1.0) として相対的に定量化した (樹脂A-FK～樹脂J-FKについては結果を図1に

示す)。別に行ったウェスタンブロットによりバンド4がFK506のターゲット分子、FKBP12であることを確認した。

- FKBP12以外の残りの3つのバンドはそれぞれチューブリン (バンド1)、アクチン (バンド2)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (バンド3) に相当し、FK506付TOYOパール樹脂に非特異的に結合 (吸着) している。
- 5 樹脂A-FK～樹脂J-FKについては図1から示されるようにいずれのタンパク質も本発明の樹脂を使用することにより顕著にその非特異的な固相表面への結合 (吸着) が抑制され、FK506付Affigel樹脂を用いた場合と同程度にまで非特異的吸着が低減化されている。また樹脂N-FKについても非特異的吸着が
- 10 顕著に抑制されていた。

#### 産業上の利用可能性

- 本発明の、親水性スパーサーを組み込んだモノマー成分を重合してなる樹脂、および当該樹脂にリガンドを固定化することによって得られるリガンド固定化固相担体は、試料中に混在する、当該リガンドに対するターゲット分子以外の物質の樹脂
- 15 および／またはリガンドへの非特異的な吸着を低減化することができる。したがってよりノイズの少ないターゲット分子の探索、同定等が可能になる。

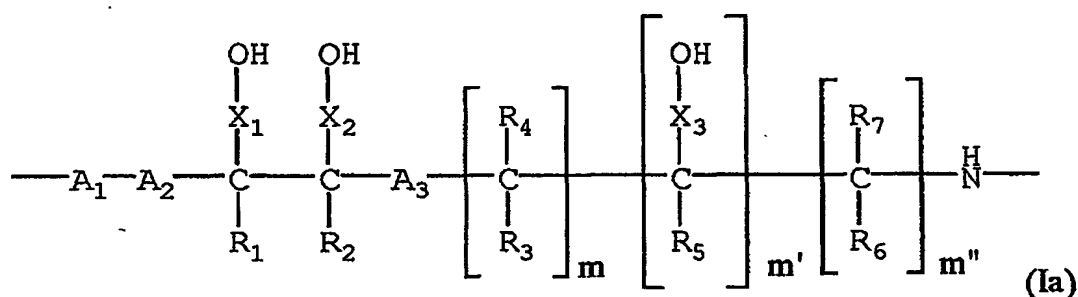
本出願は、日本で出願された特願2003-357144及び特願2004-178808を基礎としておりそれらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

## 請求の範囲

1. 原料となるモノマーを重合して得られる樹脂であって、該モノマーには親水性スペーサーが組み込まれていることを特徴とする樹脂。

5 2. モノマーが（メタ）アクリル系モノマーである、請求項1記載の樹脂。

3. 親水性スペーサーが下記式（I a）～（I e）からなる群より選択されるいずれか1つの式で表される部分構造を少なくとも1つ有するものである、請求項1または2記載の樹脂。



10 （式（I a）中、

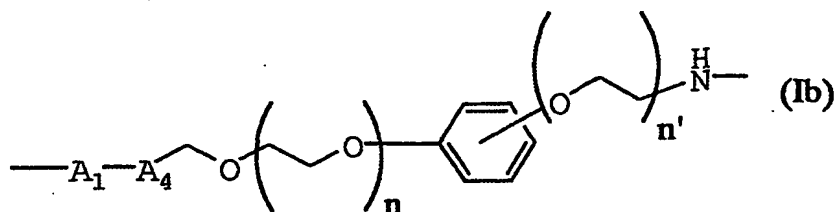
$\text{A}_1$ は $\text{---O---}$ または $\text{---NH---}$ であり、 $\text{A}_2$ は単結合または低級アルキレン基であり、 $\text{A}_3$ は適当な連結基であり、

$\text{X}_1 \sim \text{X}_3$ はそれぞれ同一または異なって単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

15  $\text{R}_1 \sim \text{R}_7$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $\text{---CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

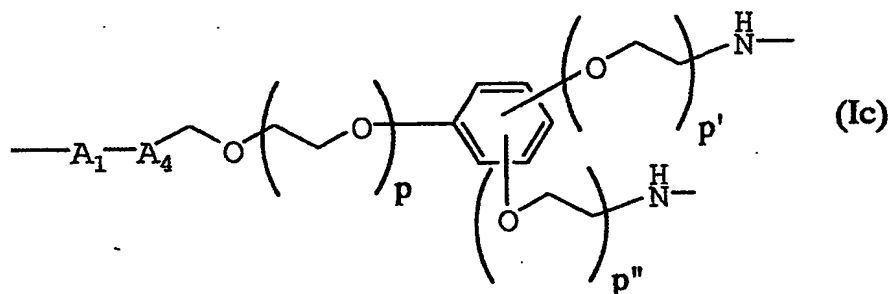
$m$ は0～2の整数であり、 $m'$ は0～10の整数であり、 $m''$ は0～2の整数であり、

20  $\text{R}_3 \sim \text{R}_7$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 $\text{X}_3$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい）；



(式 (I b) 中、

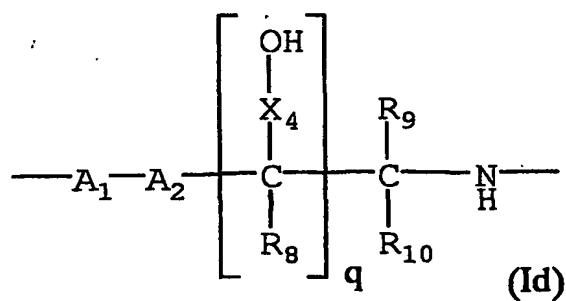
$\text{A}_1$  は  $\text{---O---}$  または  $\text{---NH---}$  であり、 $\text{A}_4$  は低級アルキレン基であり、 $n$  および  $n'$  はそれぞれ同一または異なって 1 ~ 10 の整数である) ;



5

(式 (I c) 中、

$\text{A}_1$  は  $\text{---O---}$  または  $\text{---NH---}$  であり、 $\text{A}_4$  は低級アルキレン基であり、 $p$ 、 $p'$  および  $p''$  はそれぞれ同一または異なって 1 ~ 10 の整数である) ;



10

(式 (I d) 中、

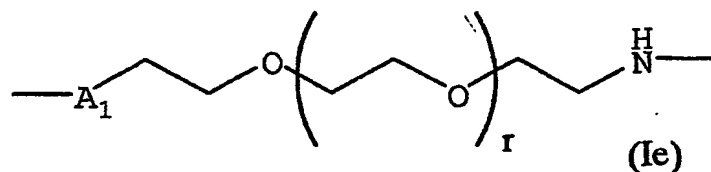
$\text{A}_1$  は  $\text{---O---}$  または  $\text{---NH---}$  であり、 $\text{A}_2$  は単結合または低級アルキレン基であり、 $\text{X}_4$  は単結合あるいは炭素数 1 ~ 3 の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

$R_8 \sim R_{10}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

$q$ は1～7の整数であり、

$R_8$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 $X_4$ が複数個

5 存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい)；

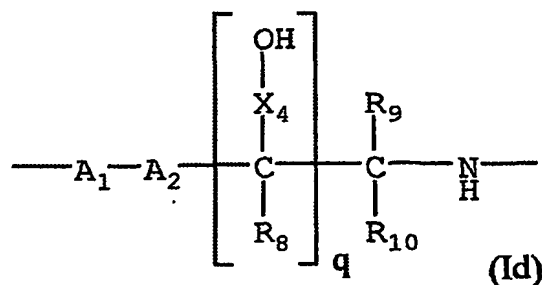


(式 (I e) 中、

$A_1$ は $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ であり、

$r$ は1～10の整数である)

10 4. 親水性スペーサーが下記式 (I d) で表される部分構造を少なくとも1つ有するものである、請求項3記載の樹脂。



(式 (I d) 中、

$A_1$ は $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ であり、 $A_2$ は単結合または低級アルキレン基であり、

15  $X_4$ は単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

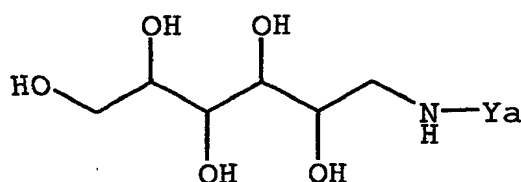
$R_8 \sim R_{10}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

$q$ は1～7の整数であり、

$R_8$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 $X_4$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい)

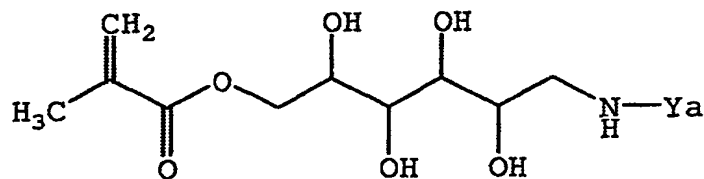
5. 式(I d)において、 $A_1$ が $-O-$ であり、 $A_2$ がメチレン基であり、 $X_4$ が単結合であり、 $q$ が4であり、複数個存在する $R_8$ が同一で水素原子であり、 $R_9$ および $R_{10}$ が水素原子である、請求項4記載の樹脂。

6. 親水性スペーサーが、下記式で表される化合物である、請求項1記載の樹脂。



(式中Y a は水素原子またはアミノ基の保護基である)

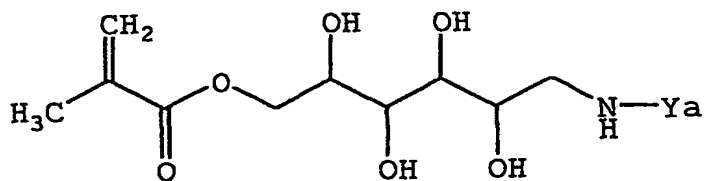
7. 下記式で表される化合物の共重合体を含む、請求項5記載の樹脂。



10

(式中Y a は水素原子またはアミノ基の保護基である)

8. 下記式で表される化合物。



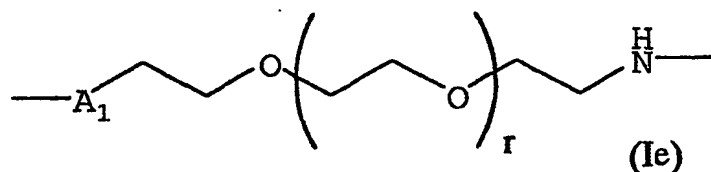
(式中Y a は水素原子またはアミノ基の保護基である)

15

9. 親水性スペーサーが下記式(I e)で表される部分構造を少なくとも1つ有す



るものである、請求項 3 記載の樹脂。



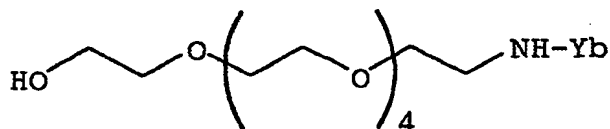
(式 (I e) 中、

$A_1$  は  $-O-$  または  $-NH-$  であり、

5  $r$  は 1 ~ 10 の整数である)

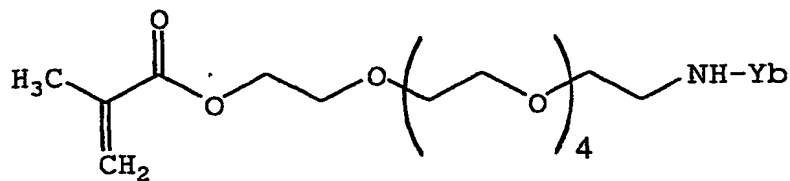
10. 式 (I e) において、 $A_1$  が  $-O-$  である、請求項 9 記載の樹脂。

11. 親水性スペーサーが、下記式で表される化合物である、請求項 1 記載の樹脂。



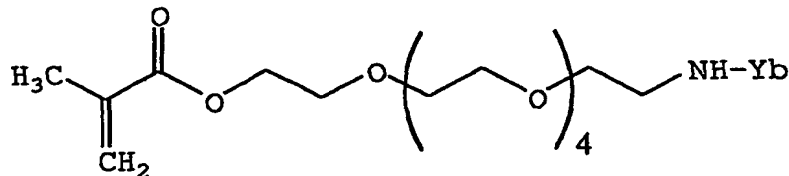
(式中 Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

10 12. 下記式で表される化合物の共重合体を含む、請求項 10 記載の樹脂。



(式中 Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

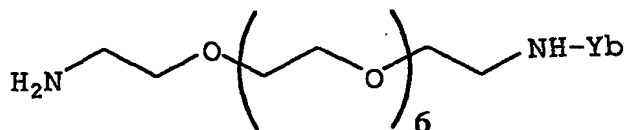
13. 下記式で表される化合物。



15 (式中 Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

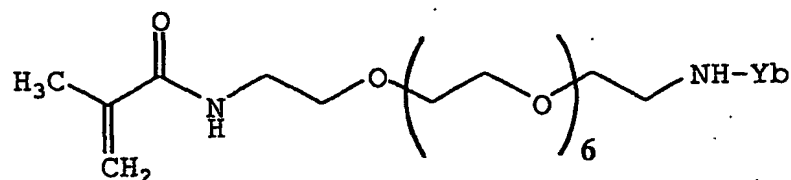
14. 式 (I-e) において、 $A_1$  が  $-NH-$  である、請求項 9 記載の樹脂。

15. 親水性スペーサーが、下記式で表される化合物である、請求項 1 記載の樹脂。



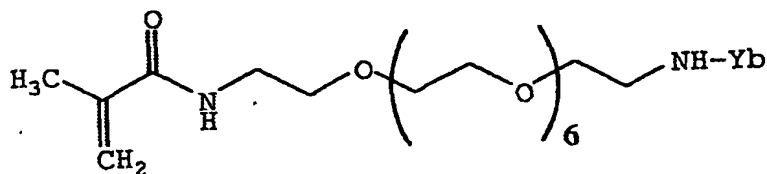
(式中 Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

5 16. 下記式で表される化合物の共重合体を含む、請求項 14 記載の樹脂。



(式中 Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

17. 下記式で表される化合物。



10 (式中 Y b は水素原子またはアミノ基の保護基である)

18. 請求項 1～7、9～12 および 14～16 のいずれか 1 項に記載の樹脂にリガンドを固定化してなる、アフィニティークロマトグラフィー用固相担体。

19. 該リガンドのターゲット分子探索用である、請求項 18 記載の固相担体。

20. リガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子のスクリーニング方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法：

15

(i) リガンドを請求項 1～7、9～12 および 14～16 のいずれか 1 項に記載

の樹脂に固定化する工程、

(i i) ターゲット分子を含むかまたは含まない試料を上記 (i) で得られたリガンドが固定化された樹脂に接触させる工程、

(i i i) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を同定し、解析する工程、および

(i v) 上記 (i i i) で得られた解析結果に基づいてリガンドに対して特異的な相互作用を有する分子をターゲット分子と判断する工程。

21. 試料中の、リガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子を測定する方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法：

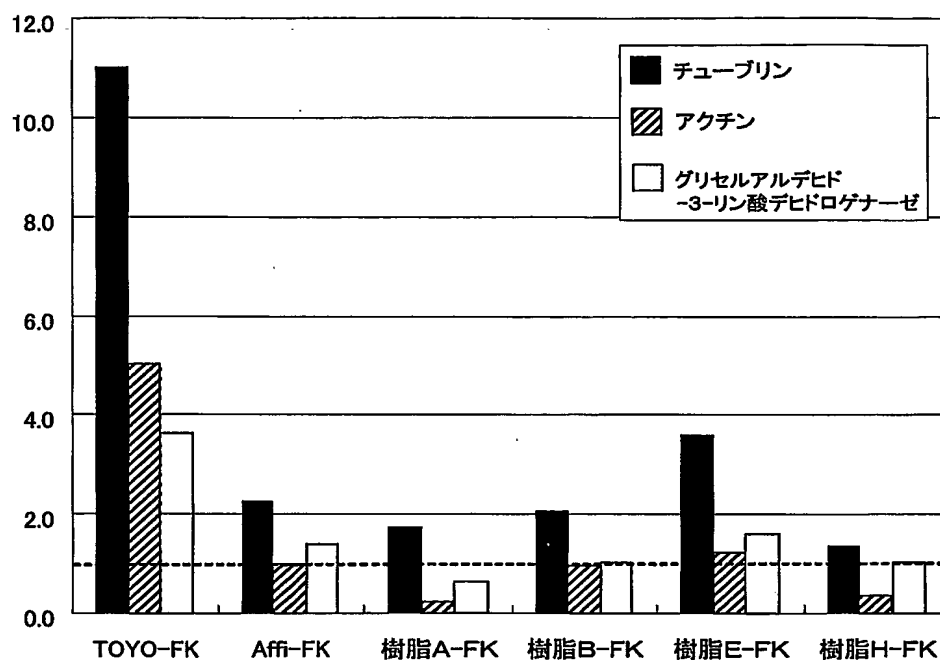
(i) リガンドを請求項1～7、9～12および14～16のいずれか1項に記載の樹脂に固定化する工程、

(i i) 試料を上記 (i) で得られたリガンドが固定化された樹脂に接触させる工程、

(i i i) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を測定し、解析する工程、および

(i v) 上記 (i i i) で得られた解析結果に基づいてリガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子を測定する工程。

図 1



### 各FKBP12を基準(1.0)とした時の主要非特異的バンドの比較

樹脂A-FK:FK506(0.1eq)付ポリOH型モノマー

樹脂B-FK:FK506付ポリOH型モノマー+メタクリル酸エチル(1:9)共重合樹脂、架橋剤10%

樹脂E-FK:FK506付ポリOH型モノマー+メタクリル酸メチル(1:9)共重合樹脂、架橋剤10%

樹脂H-FK:FK506付ポリOH型モノマー+メタクリルアミド(1:9)共重合樹脂、架橋剤10%

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015659

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C08F220/16, 220/34, G01N30/48, 33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C08F220/00-220/60

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 05-023395 A (Toyobo Co., Ltd.), 02 February, 1993 (02.02.93), Claims; Par. Nos. [0016], [0021], [0032] (Family: none)	1-3, 9-12, 14-21
X	JP 06-256434 A (Mitsui Petrochemical Industries, Ltd.), 13 September, 1994 (13.09.94), Claims (Family: none)	1, 2, 18-21
X	JP 2003-231648 A (JSR Corp.), 19 August, 2003 (19.08.03), Claims; Par. No. [0031] (Family: none)	1, 2, 18-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 January, 2005 (05.01.05)

Date of mailing of the international search report  
25 January, 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015659

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 05-311194 A (Nippon Shokubai Co., Ltd.), 22 November, 1993 (22.11.93), Claims (Family: none)	1-4
X	JP 63-105014 A (Japan Synthetic Rubber Co., Ltd.), 10 May, 1988 (10.05.88), Claims (Family: none)	1-4

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C 08 F 220/16、220/34、G 01 N 30/48、33/543

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C 08 F 220/00~220/60

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P 05-023395 A (東洋紡績株式会社) 1993. 02. 02, 【特許請求の範囲】、【0016】、【0021】、【0032】 (ファミリーなし)	1-3, 9-12, 14-21
X	J P 06-256434 A (三井石油化学工業株式会社) 1994. 09. 13, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1, 2, 18-21
X	J P 2003-231648 A (ジェイエスアール株式会社) 2003. 08. 19, 【特許請求の範囲】、【0031】 (ファミリーなし)	1, 2, 18-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 01. 2005

国際調査報告の発送日

25. 1. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐々木 秀次

4 J

3 2 3 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3455

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P 05-311194 A (株式会社日本触媒) 1993. 1 1. 22, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-4
X	J P 63-105014 A (日本合成ゴム株式会社) 198 8. 05. 10, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-4